

Rat beyin dokularında chlorpyriphos-ethyl'in neden olduğu antioksidan sistemdeki değişiklikler ile melatonin ve vitamin C + vitamin E'nin koruyucu etkileri

Fatih GÜLTEKİN*, Namık DELİBAŞ*, Süleyman KUTLUHAN**

Mehmet AKDOĞAN*, İbrahim KILINÇ*, Recep SÜTÇÜ*

* S.D.Ü.T.F. Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı,

** S.D.Ü.T.F.Nöroloji Anabilim Dalı, ISPARTA

ÖZET

Chlorpyriphos-ethyl'e (CE) maruz kalan ratların beyin dokularında melatonin ile vitamin C ve vitamin E kombinasyonunun koruyucu etkileri araştırıldı. Deney grupları şu şekilde organize edildi: Kontrol grubu (C), CE verilen grup (CE), vitamin E + vitamin C verilen grup (Vit), melatonin verilen grup (Mel), vitamin E + vitamin C + CE verilen grup (Vit+CE) ve melatonin + CE verilen grup (Mel+CE). İlgili gruplara altı gün vitaminler ve melatonin verilirken beşinci ve altıncı gün CE verildi. Beyin dokusu homojenatlarında CE grubunda C grubuna göre tiobarbitürik asit reaktif substans yüksek iken antioksidan potansiyel düşüktü ($p<0,10$). Süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz aktivitelerinde CE grubunda C grubuna göre düşük bulundu ($p<0,10$). Sonuçta, CE'nin rat beyin dokusunda oksidatif strese neden olduğu, bu oksidatif stresin CE toksisitesinde rol oynayabileceği ve melatoninin ile vitamin C ve vitamin E kombinasyonunun CE'nin beyin üzerine toksik etkilerini anlamlı olarak azaltabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Chlorpyriphos-ethyl, testis, lipid peroksidasyonu, melatonin, vitamin E, vitamin C

SUMMARY

The changes in antioxidants system caused by chlorpyriphos-ethyl in rat brain and protective effect of melatonin and vitamin C + vitamin E

The protective effect of melatonin and the combination of vitamin C and vitamin E on the brain tissue of rats treated with chlorpyriphos-ethyl (CE) was investigated. The experimental groups were as follows: Control group (C), CE treated group (CE), vitamin E plus vitamin C treated group (Vit), melatonin treated group (Mel), vitamin E plus vitamin C plus CE treated group (Vit+CE), and melatonin plus CE treated group (Mel+CE). Vitamins and melatonin were administered to appropriate groups six days. CE was applied only fifth and sixth days. In CE group, comparing with C group, thiobarbituric acid reactive substances was found to increase, whereas antioxidant potential was decreased ($p<0,10$) in brain tissue homogenates. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were high in CE group, comparing with C group ($p<0,10$). These results suggest that CE may cause oxidative stress in rat brain tissues, this oxidative stress may involve in CE toxicity, and melatonin and the combination of vitamin C and vitamin E may decrease these toxic effects caused by CE.

Key Words: Chlorpyriphos-ethyl, testis, lipid peroxidation, melatonin, vitamin E, vitamin C

Chlorpyrifos geniş spektrumlu bir organofosfat insektisittir. Chlorpyrifos'un temel toksisite me-

kanizması, chlorpyrifos-oxon tarafından sinir kavşaklarında asetilkolin esterase inhibisyonudur (1).

Haberleşme Adresi: Dr. Fatih GÜLTEKİN, S.D.Ü.T.F. Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, ISPARTA

Geliş Tarihi : 19.09.2000

Yayına Kabul Tarihi : 15.02.2001

Asetilkolinesteraz, kolinerjik sinapslarda ve nöromuskuler kavşaklarda nörotransmitter asetilkolini hidroliz eden bir enzimdir (2).

Chlorpyrifos'a prenatal maruz kalmanın embriyotoksosite, fetal letalite ve davranışsal nörotoksositeye yol açtığı bildirilmiştir (3). Chanda ve ark. (4), chlorpyrifos'a gestasyonel onikinci günde tek ve yüksek dozda (200 mg/kg) maruz kalmanın maternal beyinde yaygın nörokimyasal değişikliklere yol açtığını fakat fetal beyindeki değişikliklerin daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber, tekrarlanan düşük doz (25 mg/kg) maruz kalmaların maternal toksisite olmaksızın yaygın fetal nörodavranışsal ve nörokimyasal değişikliklere yol açtığını saptamışlardır.

Pestisitlerin farklı sınıflarının reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırdığı ve bu ksenobiyotiklerin toksik belirtilerini veren oksidatif doku hasarı oluşturduğu pekçok raporda belirtilmiştir (5-7). Reaktif oksijen türleri, pek çok toksik madde ve patolojik şartlara yanıt olarak oluşan programlı hücre ölümünde genel bir aracı olarak görev yapabilirler (6).

Malondialdehit, reaktif oksijen türlerinin hücresel membranlarla etkileşiminden kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun bir belirteçidir. Membran hasarına yol açarak, membran karakteristiklerinin değişimiyle hücresel homeostazis bozulmasına yol açabilir. Membran hasarı ve disfonksiyonu, intersellüler gap junction haberleşmesi kaybı gibi kalsiyum ve diğer iyon transport sistemlerinin de kaybına yol açabilir (8).

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, bir yaklaşıma göre enzim ve enzim olmayanlar şeklinde sınıflandırılabilirler (6, 9).

Enzimatik antioksidanların başlıcalarına örnek olarak süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) sayılabilirken, non-enzimatik olanlara vitamin C, vitamin E, melatonin ve diğerleri sayılabilir.

SOD süperoksid radikalının H₂O₂'ye dismutasyonunu katalize ederken oluşan H₂O₂ CAT veya GSH-Px tarafından H₂O'ya dönüştürülür

Vitamin C güçlü indirgeyici aktivitesi nedeniyle aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girer. C vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalının, α -tokoferole redüklenmesini sağlar (10,11).

Vitamin E çok önemli bir antioksidan olup, lipid peroksidasyonunun erken aşamalarında biomembranlardaki serbest radikal toplayıcı aktivitesi sonucu hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit, hidroksil radikalleri, tekli (singlet) oksijen, lipid peroksil radikalleri ve diğer radikal örneklerini indirger (12, 13).

Melatonin güçlü bir antioksidan maddedir. Özellikle en zararlı serbest radikal olan "hidroksil radikali" (OH.) ile reaksiyona girerek, onu indolil katyonuna dönüştürmek suretiyle ortadan kaldırır (14).

Bu araştırma, ziraatte sıklıkla kullanılan ve birçok toksisiteye neden olabilen chlorpyrifos-etil'in rat beyin dokusuna etkisini deneysel bir model üzerinde incelemek ve buna, melatonin ve C ve E vitamini kombinasyonunun etkisini biyokimyasal parametrelerle göstermek amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları :

Bu çalışmada ağırlıkları 190-240 gram arasında değişen, erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanılmıştır (n = 30). Deney süresince hayvanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) verildi. Sıçalar altı eşit gruba ayrıldı: Kontrol grubu (C), CE verilen grup (CE), vitamin E + vitamin C verilen grup (Vit), melatonin verilen grup (Mel), vitamin E + vitamin E + CE verilen grup (Vit+CE) ve melatonin + CE verilen grup (Mel+CE). E vitamini (α -tokoferol acetate; Vitamin E; SIGMA) ve C vitamini (askorbik asit; Vitamin C; Redoksan amp, ROCHE) kombinasyonu günde bir kez altı gün boyunca sırasıyla 150 mg/kg and 200 mg/kg dozlarda intramusküler olarak Vit ve Vit+CE gruplarına uygulandı. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine; SIGMA) %5'lik etil alkol içinde çözülerek aynı periyod

ve şekilde 10 mg/kg dozda Mel ve Mel+CE gruplarına uygulandı. Chlorpryfos-ethyl (Chlorpryfos-ethyl; Dursban 25; Dow Agrosience) CE, Vit+CE ve Mel+CE gruplarına beşinci günün sonunda 0. ve 21. saatte 8 numara feeding tüp yardımıyla 41 mg/kg dozunda (0,25 LD50) intragastrik yoldan verildi. Vit+CE ve Mel+CE gruplarına CE uygulanırken Vit ve Mel gruplarına da eşit hacimde serum fizyolojik uygulandı. C ve CE gruplarına da deney süresince i.m. serum fizyolojik uygulandı. Deney, CE uygulamasının 24. saatinde sonlandırıldı.

Dokuların hazırlanması:

Deney süresinin sonunda (6.gün), dekapitasyonu takiben beyin dokuları alınarak önce soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra 150 mM soğuk potasyum fosfat tamponu (pH= 7.4) içinde homojenizatörle (Ultra-Turrax T25 model) 1000 U'da 5 dakika süreyle homojenize edildi. Bu süre sonunda elde edilen %10'luk homojenatlar +4°C'de 10 dakika süreyle 6000 g'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu homojenatlarda protein, TBARS, AOP düzeyleri ile GSH-Px, SOD ve CAT aktiviteleri çalışıldı.

Lipid peroksidasyonu (thiobarbituric acid reactive substance - TBARS) tayini:

TBARS için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanıldı (15). Metodun prensibi MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532 nm'de verdikleri absorbansın ölçülmesi esasına dayanır.

AOP (Antioksidan Potansiyel) ölçümü :

Durak ve ark.'nın (16) yöntemine göre AOP belirlendi. Bu yöntemde, reaksiyon ortamı ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerine (O₂·-) bir saat süreyle maruz bırakılır. Reaksiyon ortamındaki TBARS konsantrasyonu, O₂·-radikal oluşmadan önce ve oluşturulduktan sonra ölçülür. İki değer arasındaki fark antioksidan potansiyele ters orantılıdır.

Protein tayini:

Homojenatın protein miktarı Lowry (17) yöntemine göre belirlendi.

SOD ölçümü :

SOD ölçümünde ticari kit (Ransod, UK) kullanıldı. Deneyin prensibi: Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Oluşan süperoksit radikali kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4- io-

dophenyl)-3-(4- nitrophenol)-5-phenil tetrazolium chloride ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.

GSH-Px ölçümü :

GSH-Px aktiviteleri Paglia ve Valentina'nın yöntemine göre ölçüldü (18). Yöntemin prensibi: GSH-Px kümen hidroperoksit varlığında glutatyonun oksidasyonunu katalizler. Ortamda glutatyon redüktaz ve NADPH varlığında ise okside glutatyon redükte glutatyonu dönüştürülürken NADPH da NADP+'ya dönüşür. NADPH'in 340 nm'deki absorbans düşüklüğü spektrofotometrik olarak ölçülür.

CAT ölçümü:

CAT aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre çalışıldı (19). Bu yöntemin prensibi, hidrojen peroksidin (H₂O₂) parçalanma hızının hız sabitinin (s-1, k) belirlenmesi esasına dayanır.

İstatistiksel Çalışmalar:

Genel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için Kruskal- Wallis varyans analizi testi kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılması ise Benferroni Düzeltmeli Mann - Whitney U testi ile yapıldı. Yanılma düzeyi (α)= 0,10 olarak alındı. Benferroni düzeltmesi (α/k, k= karşılaştırma sayısı) sonucunda 0,0066'dan küçük olan değerler anlamlı kabul edildi. İstatistikler "SPSS 7.0 for Windows" paket programında yapıldı.

BULGULAR

Sonuçlar topluca Tablo 1 ve Şekil 1-5 de verilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi TBARS, CE grubunda C grubuna göre yüksek iken (p<0,10), Mel+CE grubunda CE grubuna göre düşüktü (p<0,10). Ayrıca C grubuna göre Mel ve Vit gruplarında anlamlı olarak düşüktü (p<0,10). Vit ve Vit+CE grupları ile karşılaştırıldığında ise sırasıyla Mel ve Mel+CE gruplarında TBARS daha düşüktü (p<0,10).

AOP ise CE grubunda C ve Mel+CE gruplarına göre daha düşüktü (p<0,10).

SOD ve GSH-Px aktivitelerinde CE grubunda C grubuna göre düşük bulundu (p<0,10). SOD ayrıca CE grubuna göre Mel+CE grubunda daha yüksekti (p<0,10). CAT aktivitesinde ise gruplar arası Kruskal-Wallis testi ile anlamlı bir fark bulunamadı (p>0,10).

TARTIŞMA

Organofosfatlar lipofilik olduklarından lipid oranı yüksek organ ve dokularda birikme eğilimindedirler.

Tablo 1. Parametrelerin ortalama ve standart sapmaları ile grupların karşılaştırılması (tüm gruplar için n=5, Chlorpyrifos-ethyl).

	TBARS* (nmol/mgprot)	AOP* (1/nmol/mg prot.h)	SOD* (U/mg prot)	GSH-Px* (U/g prot)	CAT (k/g prot)
Kontrol grubu (C)	8.727±0.596 ^a	10.055±3.461 ^a	3.683±0.101 ^a	11.903±2.515 ^{ad}	0.273±0.036
CE uygulanmış grup (CE)	12.448±2.405 ^b	0.264±0.089 ^b	2.500±0.195 ^b	9.201±0.723 ^{bc}	0.215±0.031
Vit C+Vit E) uygu- lanmış grup (Vit)	7.339±0.876 ^c	11.155±3.268 ^a	3.748±0.156 ^a	11.002±0.904 ^{ad}	0.314±0.136
Melatonin uygu- lanmış grup (Mel)	4.200±0.541 ^d	12.805±4.460 ^a	3.827±0.181 ^a	13.229±1.257 ^d	0.303±0.083
Vit C+Vit E+CE uygulanmış gru (Vit+CE)	9.115±1.417 ^{abc}	0.690±0.788 ^{bce}	2.801±0.105 ^{bce}	9.994±0.802 ^{ac}	0.256±0.050
Melatonin+CE uygulanmış grup (Mel+CE)	7.425±1.339 ^{ac}	3.205±1.775 ^{de}	2.901±0.049 ^{de}	10.003±1.360 ^{ac}	0.288±0.088

* : p<0,01 (Kruskal-Wallis test)

abcde: Farklı harfler, karşılaştırıldıklarında anlamlı olan grupları gösterir (Benforroni Düzeltmeli Mann-Whitney U testi, p<0,02)

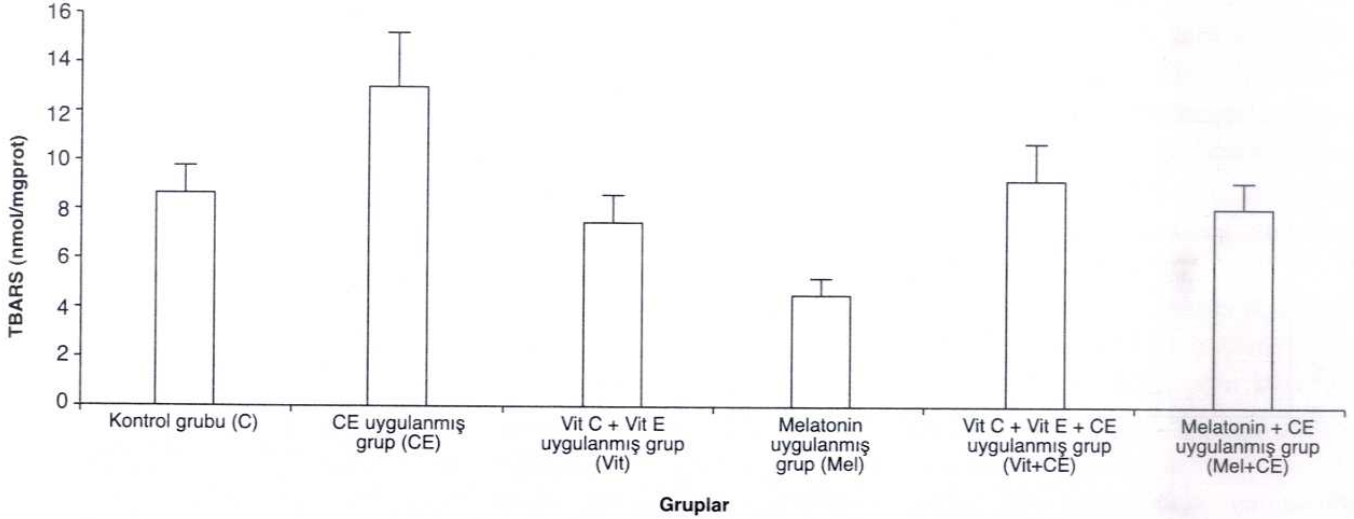
Nitekim Hunter ve ark. (20) yaptıkları bir çalışmada CE metabolitlerinin beyinde karaciğere göre beş kat fazla biriktiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla sinir sistemi CE toksisitesine yüksek oranda maruz kalacaktır.

Song ve ark. (21), chlorpyrifos'un gelişen sinir hücreleriyle direk etkileşime girerek sinir hücresi büyümesi ve replikasyonunu inhibe edebileceğini ileri sürmüşlerdir. Dam ve ark. (22), beyin sapı ve ön beyinde DNA sentezinin inhibe edildiğine fakat RNA ve protein sentezinde etkilerin görülmediğine dikkati çekerek chlorpyrifos'un makromoleküler sentez üzerindeki etkilerinde bir seçicilik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bagchi ve ark. (6), sıçanlara 0. ve 21. saatlerde oral olarak chlorpyrifos uygulamasını izleyerek, 24. saatte beyin nüklear DNA-tek kolu

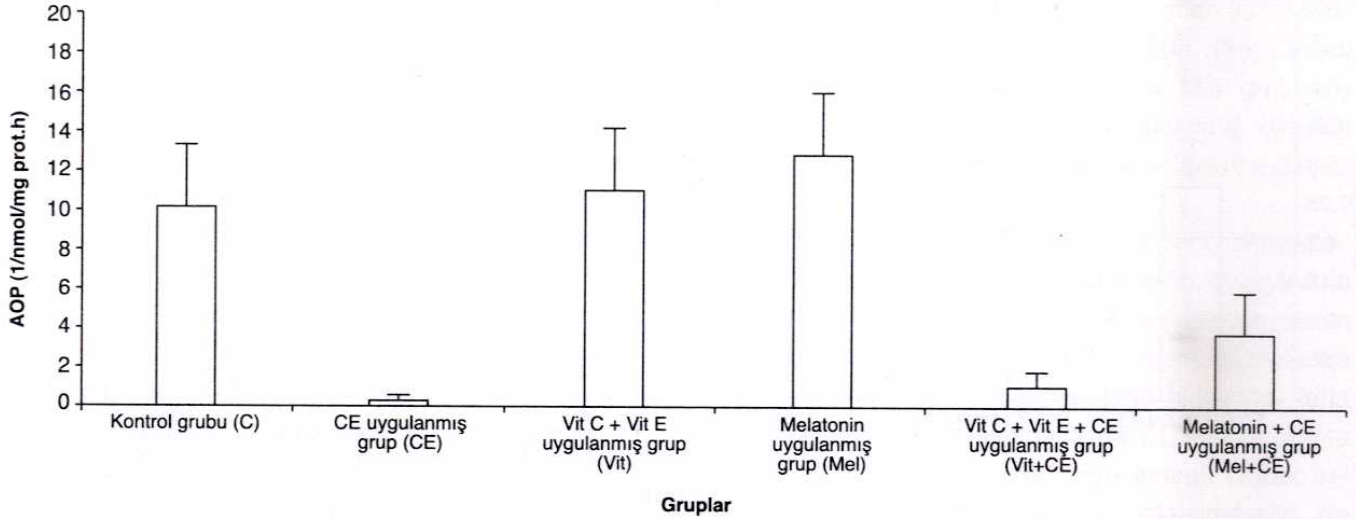
kırıklarında ise 1.4 kat artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca organofosfatların, uygulandıktan birkaç hafta sonra primer olarak ekstremiteleri etkileyen "gecikmiş periferik nöropati"ye yol açtıkları gösterilmiştir (2, 23).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar göstermiştir ki, bazı organofosfat insektisitler asetilkolin esteraz inhibisyonu yanısıra ROS üretimini artırmaktadır ve böylece oksidatif doku hasarlarına neden olmaktadır (5,8,24,26).

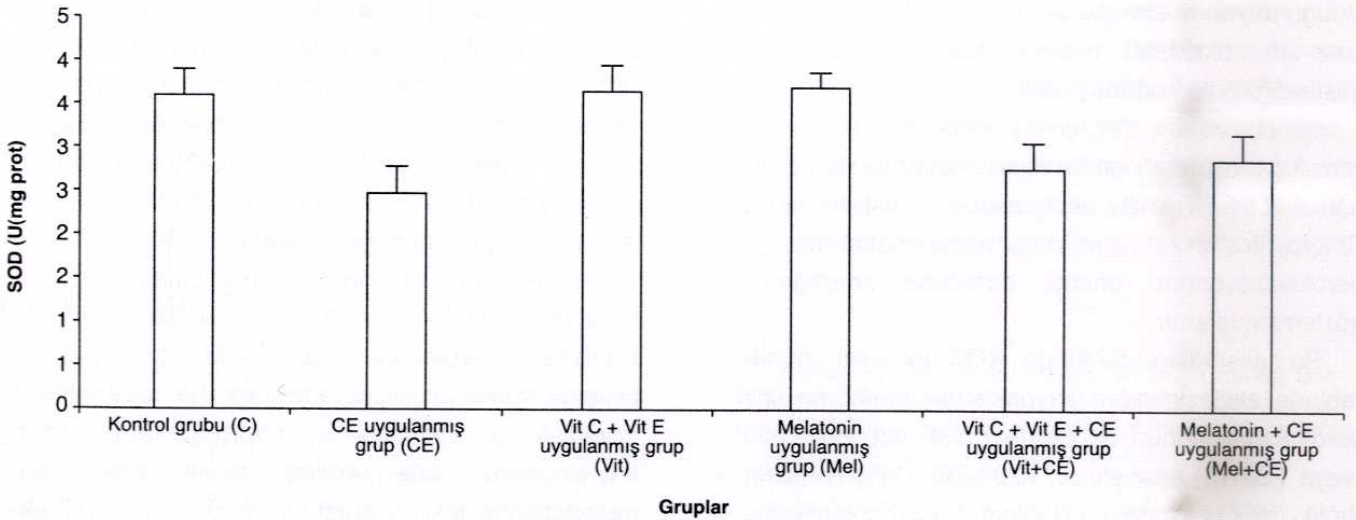
Jayati ve ark. (7), in vitro şartlarda organofosfat insektisit malationun insan fetus beyinde, erken gestasyonda malation muamelesiyle G6PDH ve glutatyon redüktaz aktivitesinde indirgenmeyi izleyerek glutatyon düzeyinde bir düşme gözlemlendiğini bildirmişlerdir. İlaveten, MDA formasyonunda artma



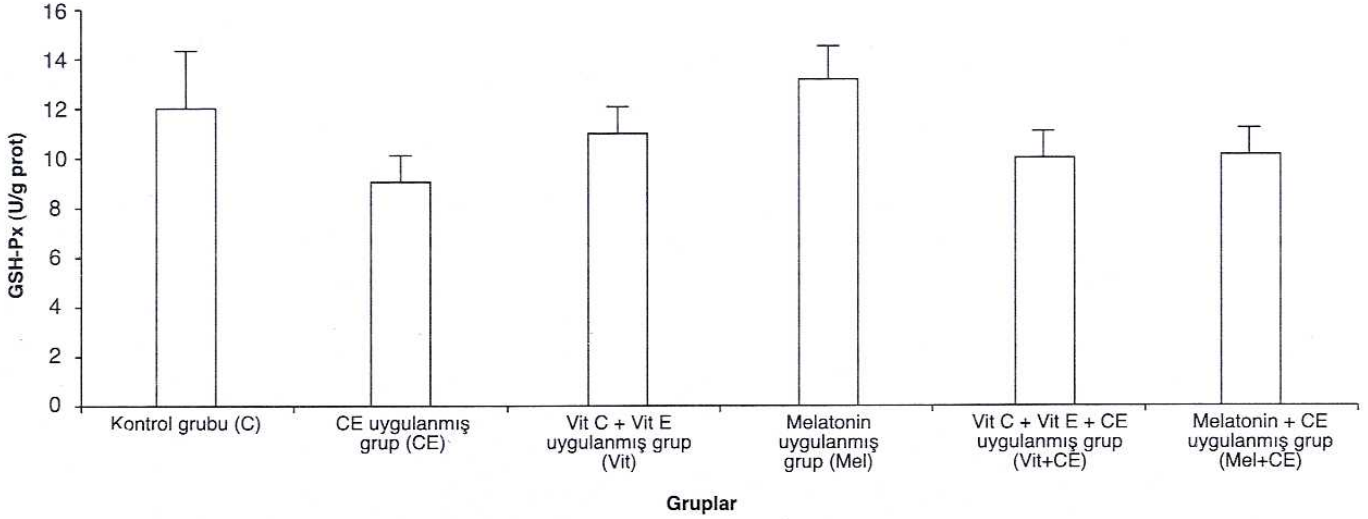
Şekil 1. Grupların TBARS (Thiobar bitürük asit reaktif substans) değerleri.



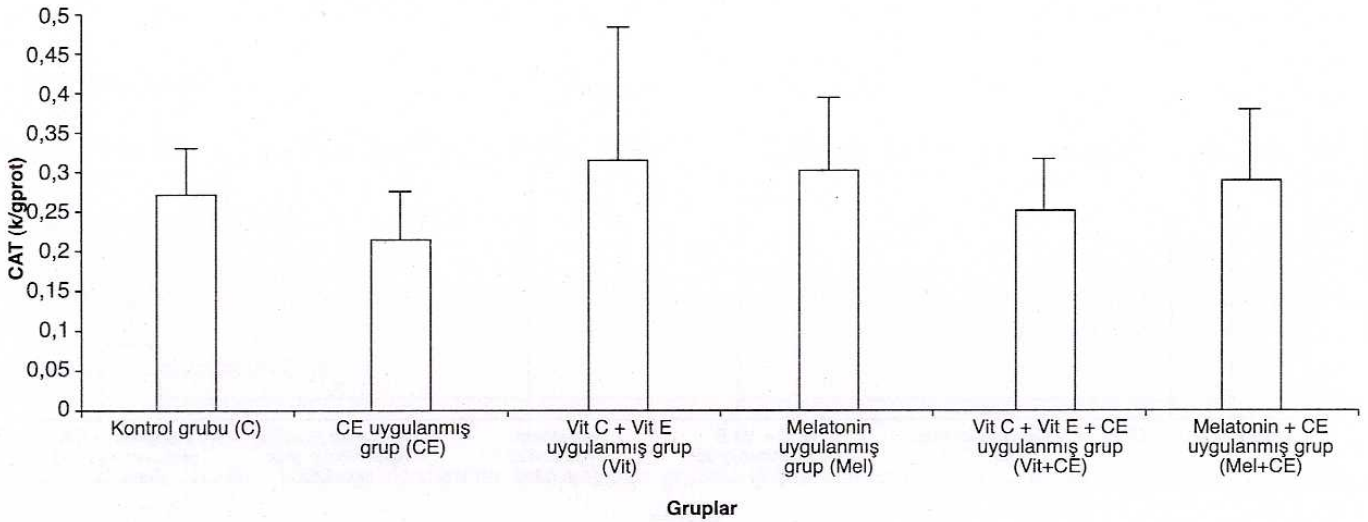
Şekil 2. Grupların AOP (Antioksidan Potansiyel) değerleri.



Şekil 3. Grupların SOD (Süperoksit Dismutaz) aktiviteleeri.



Şekil 4. Grupların GSH-Px (Glutasyon Peroksidaz) aktiviteleri.



Şekil 5. Grupların CAT (Katalaz) aktiviteleri.

olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun, fetüs beyin dokusunun oksidatif hasara karşı hassasiyetini gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Bagchi ve ark. (6), chlorpyrifos'un in vivo ve in vitro karşılaştırmalı etkilerini hayvanlarda ve kültüre nöroaktif PC 12 hücrelerinde araştırmışlardır. Chlorpyrifos'un rat beyin doku homojenatlarında lipid peroksidasyonunu önemli derecede artırdığını gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmaların tümünde, ROS hücrel membranlarla etkileşiminden kaynaklanan membran lipid peroksidasyonunun bir belirteci olan malondialdehit (veya TBARS) artmıştır (6, 7, 24-26). Çalışmamızda da, iki doz (41 mg/kg; LD50'nin %25'i) chlorpyrifos uygulamasını takiben rat beyin dokusunda CE gru-

bunda C grubuna göre TBARS düzeyi artmıştı. Bu artış, chlorpyrifos veya metabolitlerinin neden olduğu ROS artışına bağlı olabildiği gibi, chlorpyrifosun neden olduğu antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ve bunun sonucunda AOP'in azalması, dolayısıyla ROS'un ortamdan yeterince uzaklaştırılmayışına da bağlı olabilir.

Antioksidan savunma mekanizmalarıyla antioksidan enzimler in vitro ve in vivo pestisit ve insektisitlerin etkileriyle değişir. Bu konuda farklı çalışma sonuçları rapor edilmiştir. Bir organofosfat insektisit olan malathion'un in vitro şartlarda insan fetuslarından elde edilen beyin doku homojenatlarına etkileri araştırılmış; SOD ve CAT aktivitelerinde önemli inhibisyona neden olduğu sap-

tanmıştır (7). Aynı çalışmada, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili olarak bilinen GSH-Px aktivitesi ise, düşük konsantrasyonlardaki malathion muamelesi ile artarken, yüksek konsantrasyonlarda değişmeden kaldığı gösterilmiştir. Bu da, düşük konsantrasyonlardaki toksik ajanın dokuda oluşturduğu oksidatif hasara karşı GSH-Px artmış aktivitesi ile bir adaptasyon gösterirken, yüksek konsantrasyonlardaki maruz kalmaya adaptasyon mekanizmasının gözlenmediğini gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Bir başka çalışmada organofosfat pestisit olan quinalphos'un (LD50 dozunda) rat beyin dokularında antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (24). Bu çalışmanın sonuçlarına göre; SOD ve GSH- Px aktiviteleri değişmezken yalnızca CAT aktivitesi artmıştır.

Bizim çalışmamızda CE grubunda SOD ve GSH-Px aktiviteleri C grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,10$). CAT aktivitesinde ise rakamsal olarak bir düşüklük olmakla beraber fark anlamlı değildi. Enzim aktivitelerindeki bu düşüklüğün nedeni CE'nin bu enzimleri direk inhibisyonuna bağlı olabilir. Ayrıca CE'nin kendisi ROS'ta bir artışa neden oluyor olabilir ve artan ROS bu enzimleri inhibe ediyor olabilir. Nitekim süperoksit radikalının GSH-Px (27) ve CAT (28) aktivitelerini inhibe ettiği, singlet oksijen ve peroksil radikalının ise SOD ve CAT (29) aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir.

C vitamini ve E vitamini kombinasyonu uygulamalarının çeşitli oksidanların neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu olduğuna ilişkin birçok rapor mevcuttur (30, 31). Bizim çalışmamızda da vitamin kombinasyonu uygulanması TBARS'ı C grubuna göre Vit grubunda anlamlı olarak düşürmüştür. Bu uygulama ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber ($p > 0,10$) rakamsal olarak CE'nin neden olduğu TBARS artışını azaltırken yine CE'nin neden olduğu AOP düşüşünü artırmıştır.

KAYNAKLAR

1. Amitai G, Moorad D, Adani R, Doctor BP. Inhibition of acetylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(3): 293-9.
2. Bigbee JW, Sharma KV, Gupta JJ, Dupree JL. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect* 1999; 1: 81-7.
3. Lassiter TL, Padilla S, Mortensen SR, Chanda SM, Moser VC, Barone S Jr. Gestational exposure to chlorpyrifos : apparent protection of the fetus? *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 152(1): 56-65.
4. Chanda SM, Pope CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 53(4): 771-6.

Melatonin güçlü antioksidan etkiye sahiptir. Yüksek derecede toksik bir ksenobiyotik olan paraquat'ın sıçan akciğer dokusunda (32), bakteriel lipopolisakkarit ile muamele edilmiş sıçanların birçok dokusunda (33), karbontetraklorür hepatotoksitesinde (34) ve kainik asidin rat beyin, beyincik, hippokampus ve hipotalamusunda (35) neden olduğu peroksidatif hasarın bir göstergesi olan, artmış TBARS düzeyleri üzerine melatoninin azaltıcı etkileri gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da CE grubuna göre Mel+CE grubunda ve C grubuna göre Mel grubunda TBARS anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,10$).

Melatonin güçlü bir antioksidan olmasının yanında antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz aktivitesi üzerine de etkilidir. Sıçanlar ekzojen olarak melatoninle muamele edildiği zaman beyin GSH-Px aktivitesinin uygulamadan yarım saat sonra iki katına çıktığı bildirilmiştir (36). Bizim çalışmamızda da C grubuna göre Mel grubunda GSH-Px aktivitesi daha yüksek bulunmuş olmakla beraber bu yükseklik istatistiki olarak anlamlı değildi ($p > 0,10$).

AOP endojen antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerinin toplam etkilerini yansıtır. Tek tek antioksidan enzim veya enzim olmayan antioksidan madde düzeylerine göre vücudun antioksidan sistemi hakkında daha gerçekçi bilgi verir. Çalışmamızda CE verilen grupta antioksidan enzimleri direk veya indirek olarak inhibe olmuştur. Antioksidanların eklenmesiyle de AOP'de artış görülmüştür. Bu, CE'nin antioksidan enzimler yanında enzim olmayan antioksidanlar üzerine de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgulardan hareketle, CE'nin toksik etkilerinin rat beyin dokusunda oksidatif strese neden olduğu, melatoninin, vitamin C ve vitamin E kombinasyonunun CE'nin beyin üzerine toksik etkilerini anlamlı olarak azaltabileceği kanaatine varıldı.

5. Agrawal D, Sultana P, Gupta G. S. D. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Food Chem Toxicol* 1991; 29(7): 459-62.
6. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 1995; 104(1-3): 129-40.
7. Jayati Gupta, Chhabi Datta. Effect of malathion on antioxidant defence system in human fetus-An in vitro study. *Ind J Exp Biol* 1992; 35:2-4.
8. Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(3): 196-208.
9. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 479-80.
10. Lunec J, Blake D, Oxygen Free Radicals : Their relevance to disease processes . In: Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. *The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease*. Balliere Tindall, London, 1990; 189-212.
11. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants . *Clin Cardiol* 1993; 16: 1-9.
12. Mayes PA. Structure and Function of the Water-soluble Vitamins. In : Murray RK, Granner DK, Mayes PA - Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 23. ed. Lange medical publication, London, 1993; 573-87.
13. Gey KF. Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease . *Br Med Bull* 1993; 49(3): 679-99.
14. Ozguner F, Kerman M, Delibas N, Gultekin F. The relationship of age related decrease in melatonin with oxidative damage and mental status. *Biomed Res* 2000; 11(1): 61-5.
15. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.
16. Durak I, Karabacak HI, Büyükkocak S, Çimen MYB, Kaçmaz M, Ömeroğlu E, Öztürk HS. Impaired antioxidant defence system in the kidney tissues from rabbits treated with cyclosporine. *Nephron* 1998; 78:207-11.
17. Lawry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-72.
18. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-69.
19. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
20. Hunter DL, Lassiter TL, Padilla S. Gestational exposure to chlorpyrifos : comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 158(1): 16-23.
21. Song X, Violin JD, Seidler FJ, Slotkin TA. Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro : macromolecule synthesis in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 151(1): 182 -91.
22. Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos : delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 108(1-2): 39-45.
23. Fikes JD, Zachary JF, Parker AJ, Beasley VR. Clinical, biochemical, electrophysiologic and histologic assesment of chlorpyrifos induced delayed neuropathy in the cat. *Neurotoxicology* 1992; 13(3): 663-78.
24. Dwivedi PD, Mukul D, Khanna SK. Role of cytochrome p-450 in quinalphos toxicity : Effect on hepatic and brain antioksidant enzymes in rats. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 437-44.
25. Hai DQ, Varga SI, Matkovics B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1997; 117(1): 83-8.
26. Steevens JA, Benson WH. Toxicological interactions of chlorpyrifos and methyl mercury in the amphipod, *Hyalella azteca*. *Toxicol Sci* 1999; 52(2): 168-77.
27. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240(2): 500-8.
28. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 1982; 257: 5751-4.
29. Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 285-90.
30. Biri H, Ozturk HS, Buyukkocak S, Kacmaz M, Cimen MY, Unal D, Birey M, Bozkirli I, Durak I. Antioxidant defense potential of rabbit renal tissues after ESWL: protective effects of antioxidant vitamins. *Nephron* 1998; 79(2): 181-5.
31. Campisi A, Di Giacomo C, Russo A, Sorrenti V, Vanella G, Acquaviva R, Li Volti G, Vanella A. Antioxidant systems in rat lens as a function of age: effect of chronic administration of vitamin E and ascorbate. *Aging (Milano)* 1999; 11(1): 39-43.
32. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 1994; 56: 83-9.
33. Severynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A. Lipopolysaccharide- induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol* 1995; 293: 327-34.
34. Daniels WMV, Reiter RJ, Melchiorri D, Severynek E, Pablos MI, Ortiz GG. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase activity. *J Pineal Res* 1995; 19: 1-6.
35. Melchiorri D, Reiter RJ, Severynek E, Chen LD, Nistico G. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB J* 1995; 9: 1205-10.
36. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menendez -Pelaez A, Chen LD. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26: 497-502.