



IJBCM

International Journal of Basic and Clinical Medicine
Uluslararası Temel ve Klinik Tıp Dergisi

Research Article / Araştırma Makalesi

Malathion ve Onosma nigricale (Boraginaceae)'nin Fare Böbrek Dokusunda Leptin Üzerine Etkilerinin Immunohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Immunohistochemical Examination on the Effects of Malathion and Onosma Nigricale (Boraginaceae) on the Leptin in Renal Tissues of Mice

Buket Bakır¹, Sevda Eliş Yıldız², Dinçer Erdağ³, Mahmut Sözmen⁴, Hasan Asker⁵

¹Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Tekirdağ
²Kafkas Üniversitesi Kars Sağlık Yüksekokulu, Kars
³Kafkas Üniversitesi Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kars
⁴Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD, Samsun
⁵Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, Kars

Özet

Amaç

Bu çalışmada, tarımda bir insektisit olarak kullanılan malathion'un neden olduğu oksidasyon parametreleri üzerine Onosma nigricale (Boraginaceae)'den elde edilen bitkisel özütün böbrek dokusunda leptin üzerine etkisinin immunohistokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

Materyal-Metot

Çalışmamızda, toplam 48 adet erkek fare kullanıldı. Gruplar; kontrol (grup 1), malathion'un taşıt maddesi olan mısır yağı (grup 2), bitki özütünün taşıt maddesi olan serum fizyolojik (grup 3), malathion (grup 4), Onosma nigricale (grup 5), ve Onosma nigricale + malathion grubu (grup 6) olmak üzere toplam 6 grup olarak belirlendi. Böbreklerden alınan kesitlere leptin immunoreaktivitesini belirlemek için Streptavidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks tekniği uygulandı. Hazırlanan kesitlere histolojik incelemeler için hematoksilin-eosin ve Crossman'ın üçlü boyama yöntemi kullanıldı.

Bulgular

Kontrol grubu ile taşıt kontrol grupları olan serum fizyolojik grubu ve mısır yağı grupları ile Onosma nigricale, malathion ve Onosma nigricale + malathion gruplarının böbrek dokularında herhangi bir lezyon tespit edilmedi. Diğer yandan, kontrol, mısır yağı, serum ve malathion grubundaki farelerin tubulus proksimalis ve tubulus distalis epitel hücrelerinde güçlü leptin immunoreaktivite görülmesine karşın Onosma nigricale ve Onosma nigricale + malathion grubu farelerde ise zayıf leptin immunoreaktivitesi tespit edildi.

Sonuç

Fareler ile yaptığımız çalışmada, yurdumuzda insektisit olarak yaygın kullanılan malathion'un fare böbreğinde leptin aktivitelerini etkilediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, leptin, malathion, Onosma nigricale

Abstract

Aim

The purpose of this study was to determine the effects of the plant extract, which is obtained from Onosma nigricale due to the oxidation parameters caused in mice by Malathion that is used as an insecticide in agriculture, on leptin in renal tissues in an immunohistochemical way.

Material-Methods

A total of 48 male mice were used in our study. 6 groups were determined as the control (group 1), maize oil which is the transport agent of malathion (group 2), normal saline which is the transport agent of plant extract (group 3), Onosma nigricale (group 4), malathion (group 5) and Onosma nigricale plant extract + malathion (group 6) group. The localization of leptin in the renal tissue was determined using the method of Streptavidin-Biotin-Peroxidase. Hematoxylin-eosin and triple staining methods were used for histological and pathological examinations.

Results

No lesion was determined in renal tissues of the control group, normal saline group, maize oil group, Onosma nigricale malathion and onosma nigricale + malathion groups. Leptin immunoreactivity was determined with a weak intensity in renal tubulus proximalis and distalis epithelial cells of mice in the onosma nigricale group, and onosma nigricale + malathion group and with a high intensity in tubulus proximalis of other groups.

Conclusion

This study conducted on mice revealed that malathion, which is commonly used as insecticide in Turkey, affects leptin activities in renal tissue of mice.

Keywords: Renal tissue, leptin, malathion, Onosma nigricale

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Yrd. Doç. Dr. Buket Bakır
Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye
Telefon: (+90) 2822504715
E-mail: buhal@hotmail.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 10.10.2014
Date Accepted / Kabul Tarihi: 17.02.2015

Int J Basic Clin Med 2015;3(2):60-5

Giriş

Tarımdan elde edilen verim düzeyini olumsuz yönde etkileyen böcekler, kemiriciler, mantarlar ve yabancı otlar gibi zararlılara karşı kullanılan kimyasal maddelere genel olarak pestisitler denilmektedir¹. Bu kimyasallar, ekonomik bir şekilde üretilmeleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir². Organik fosforlu (organofosfat) bileşikler en çok kullanılan pestisit grubudur³. Malathion'un dahil olduğu organik fosforlu bileşimler, tarım ürünlerinin korunmasında ve halk sağlığında çeşitli böceklerle karşı çok yaygın kullanımı olan insektisitlerden birisidir⁴. Malathion vücutta başlıca karaciğerde sitokrom P450 enzimi ile yıkılanarak toksik metaboliti olan malaoksan'a dönüşmekte ve detoksikasyon ürünü olarak dimetiltiyofosfat (DMTP) oluşmaktadır. Vücuttan çoğunlukla idrar, safra ve dışkı yoluyla atılmaktadır⁵. Malathionun böbrek alkalin fosfataz aktivitesini artırıp, karaciğer ve ince bağırsak alkalin fosfataz aktivitesini azalttığı gözlenmiştir⁷.

Leptin, 1994 yılında Friedman ve arkadaşları⁷. tarafından obez geninin bir ürünü olarak belirlenmiştir⁸. Leptin, Leptin hormonunun enerji ve yağ metabolizması ile bağlantılı, vücut ağırlığını ve enerji metabolizmasını düzenleyen bir hormondur^{9,10}. Leptin hormonunun yağ dokusundan sekresyonunu dolaşımdaki hormon düzeyi belirler^{11,12}. Bu hormon hipotalamik reseptörleri üzerinden primer olarak metabolik hızı artırır ve gıda alımını azaltır^{11,13}. Leptin böbrekler aracılığı ile dolaşımdan alınarak idrarla atılırken periferel dokularda dejenerasyon yolu ile temizlenir¹⁴.

Halk arasında sorma, sormuk olarak da isimlendirilen *Onosma nigricaula* Boraginaceae familyasına ait iki yıllık otsu ve çok yıllık otsu ve odunsu bitkilerdir. *Onosma nigricaula* Türkiye için endemik bir bitki türüdür.

Bu bitki türünün kökleri Doğu Anadolu Bölgesi'nde yara ve yanıkların tedavisinde uygulama alanı bulmaktadır¹⁵. Diyabet oluşturulmuş ratlar üzerinde yapılan araştırmada bitkinin köklerinden elde edilen ekstraktın kan glukoz değerlerini düşürdüğü ve antidiyabetik etkisi olduğu¹⁶ ayrıca farklı tümör çeşitlerinin hücre döngüsünde ve apoptosiste rolünün olduğu ileri sürülmüştür¹⁷.

Bu çalışmada; malathion'un oksidan özelliklerine karşı, koruyucu ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu bildirilen *Onosma nigricaula*'nin böbrek dokusunda morfolojik olarak koruyucu etkiye sahip olup olmadığının araştırılması aynı zamanda leptin üzerine etkisinin immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bitki Materyali

Onosma nigricaula (Boraginaceae), Mayıs ve Eylül ayları arasında Kars ilinden toplandı ve bu bitkiden sokselet sistemiyle özüt alma işlemi gerçekleştirildi. Her deney için 25 gr tartılarak fizyolojik tuzlu suda çözdürüldü ve deney hayvanlarına intraperitoneal yolla enjekte edildi. Bitki özütünün ve bitki alt türünün hangi dozlarda antioksidan etkisinin olduğunun belirlenmesinde Erdağ ve ark.¹⁸ yaptıkları çalışma dikkate alındı.

Hayvan Materyali

Araştırma için Kafkas Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı. Araştırmada; ergenlik dönemine erişmiş, 7-8 haftalık, yaklaşık 22-35 g ağırlığında, daha önce çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış toplam 48 adet aynı cins erkek fare (*Mus musculus*) kullanıldı. Hayvanlar 22 ± 2°C ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda standart kafeslerde

barındırılıp, normal fare yemi ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslendi.

Her bir grupta 8 adet erkek fare olmak üzere deney grupları oluşturuldu. Hayvanlara verilecek kimyasal madde ve ekstraktlar 100 mg/10 ml olacak şekilde uygun solüsyonlarda çözdürüldü (malathion mısır yağında, ekstraktlar fizyolojik tuzlu suda çözdürüldü). Sonuç olarak, negatif kontrol grubu hariç diğer gruplara 21 gün süresince hergün 0,2 ml/ 20 g fare hesabında çözelti, su ya da mısır yağı intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi.

Deney için 6 ayrı grup oluşturuldu

1.(Kontrol Grubu) fareler negatif grup olarak tasarlanıp, hiçbir madde uygulaması yapılmadı.

2.Grup farelere malathion'un taşıyıcı maddesi olan mısır yağı uygulandı.

3. Grup farelere günlük olarak bitki özütünün taşıyıcı maddesi olan serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) uygulandı.

4.Grup farelere günlük olarak malathion mısır yağı içerisinde çözdürülerek uygulandı.

5.Grup farelere günlük Onosma nigricaula (Boraginaceae) bitki özütü, serum fizyolojik içerisinde çözdürülerek uygulandı.

6.Grup farelere günlük Onosma nigricaula (Boraginaceae) bitki özütü + malathion uygulandı.

Histolojik İnceleme

21 günlük deneme periyodunun sonunda farelerin vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile ötenazi edilerek böbrek dokuları alındı ve rutin histolojik tespit ve takip aşamalarından geçirilerek parafinde bloklandı. Bu bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler leptin immunoreaktivitesini incelemek için, oda sıcaklığında 1 saat süre ile leptin primer antikoru (Rabbit Polyclonal IgG antibody A-20,

sc482, Santa Cruz, CA, 1/500) uygulandı ve Streptavidin-biotin peroksidaz tekniği 19 (Invitrogen Histostain Plus Broad Spectrum (AEC) Ref. 85.9943) kullanıldı. Leptin immunoreaktivitesinin spesifik olup olmadığını belirlemek için, negatif kontrol uygulaması yapıldı. Ayrıca dokuların histolojik görünümünü incelemek için hematoksil-eozin ve Crossman'ın üçlü boyama 20 uygulandı. Dokulardaki immunoreaktivitenin yoğunluğu, reaksiyonun şiddetine ve dokudaki yoğunluğuna göre semikantitatif olarak değerlendirildi. Değerlendirme, iki bağımsız gözlemci tarafından boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++), şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek yapıldı.

Bulgular

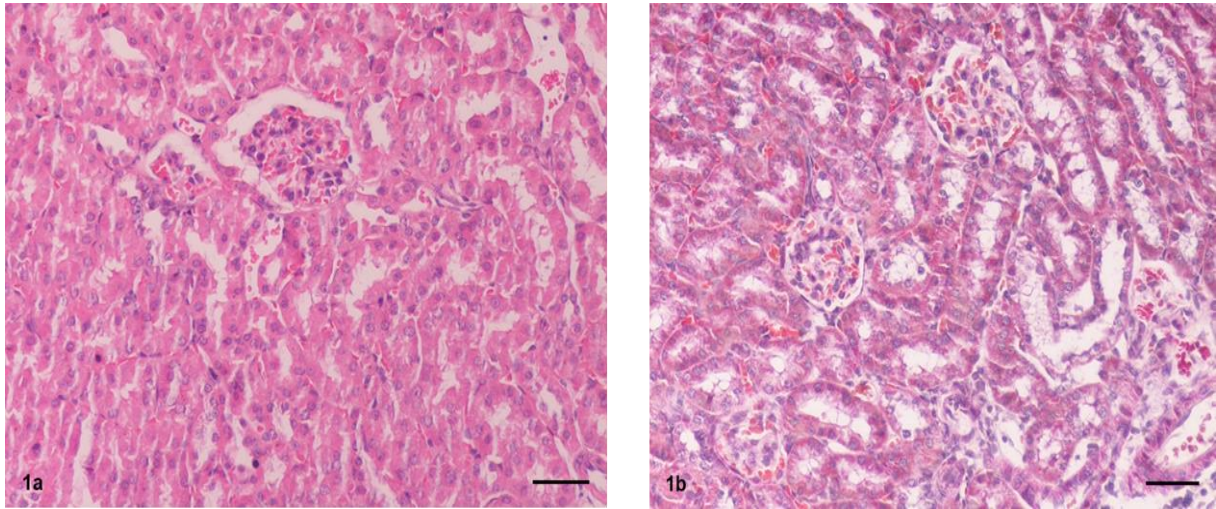
Histolojik Bulgular

Böbrek dokusunun histolojik olarak incelenmesi amacıyla yapılan hematoksil-eozin ve Crossman'ın üçlü boyamada, böbreğin korteks ve medulla kısımları incelenmiştir. Bu kısımlarda böbreğin fonksiyonel üniteleri olan nefronlar ve nefronları oluşturan yapılar ile toplayıcı borucuk yapıları ve bağ doku alanları incelenmiş, tüm bu yapıların normal histolojik görünümde olduğu ve gruplar arasında histolojik olarak bir farkın bulunmadığı görülmüştür (Şekil 1a-1b).

İmmunohistokimyasal Bulgular: Yapılan mikroskopik incelemede bütün gruplarda spesifik leptin immunoreaktivitesi tespit edildi. Kontrol, mısıryağı, serum fizyolojik ve malathion gruplarının böbrek korteksinde güçlü leptin immunoreaktivitesi tespit edildi. Tüm grupların böbrek medullasında ise leptin immunoreaktivitesinin oldukça zayıf olduğu görüldü (Tablo 1). Onosma nigricaula ve

Onosma nigricaula + malathion grubunda immunoreaktivitenin zayıf olduğu görüldü. Tüm grupların korteksteki leptin immunoreaktivitesinde, bölgelere göre farklılıklar tespit edildi. Kontrol, mısıryağı, serum fizyolojik ve malathion gruplarındaki farelerin tubulus proksimalislerinde ve tubulus distalislerinde yoğun immunoreaktivite (+3) tespit edilmesine karşın (Figure 2a) Onosma nigricaula ve Onosma nigricaula + malathion grubunda ise birbirine benzer olarak (+1) yoğunlukta immunoreaktiviteye rastlandı (Figure 2b).

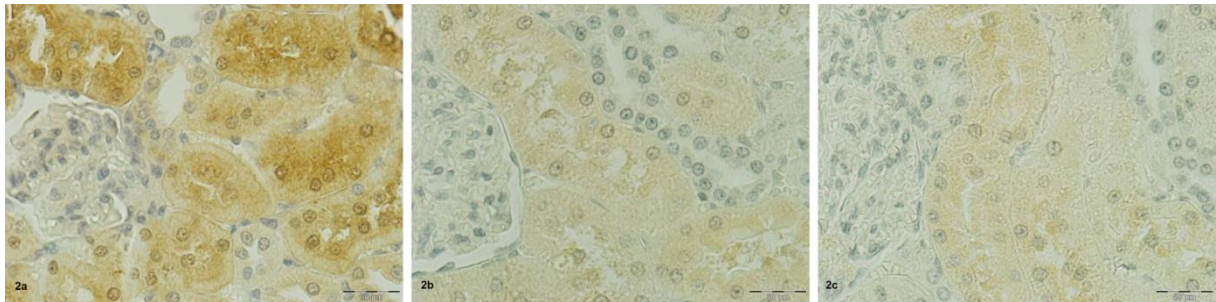
Görülen bu immunoreaktivitenin korteksin dış kısmına nazaran medullaya komşu olan iç kısmında daha belirgin olduğu dikkati çekti. Meydana gelen immunoreaktivitenin genellikle intrasitoplazmik ve çekirdek boyanması şeklinde olduğu izlendi. İncelenen bütün grupların böbrek dokularının glomerullarında, damar endoteli ile Bowman kapsülünde ve diğer bağ doku alanlarında leptin immunoreaktivitesine (0) rastlanmadı.



Şekil 1a. Kontrol grubu fare böbreği. Normal yapıdaki böbrek tubulusları ile glomeruluslar. H.E. **1b.** Malathion + Onosma nigricaula grubuna ait fare böbreği. Normal yapıdaki böbrek tubulusları ile glomerulus. Crossman's Üçlü Boyanma. Bar:100 µm.

Tablo 1. Gruplararası leptin immunoreaktivitesinin karşılaştırılması

Hücre Tipi	Kontrol	Mısır yağı	Serum	Malathion	<i>Onosma nigricaula</i>	Malathion + <i>Onosma nigricaula</i>
Tubulus Proksimalis	+++	+++	+++	+++	+	+
Tubulus Distalis	+++	+++	+++	+++	+	+
Glomerulus	-	-	-	-	-	-
Medulla	-	-	-	-	-	-



Şekil 2a. Kontrol grubuna ait böbrek kesiti. Tubulus proksimalisde ve tubulus distaliste güçlü yoğunlukta leptin immunoreaktivitesi. **2b.** Malathion + Onosma nigricaula grubuna ait böbrek kesiti. Tubulus proksimalisde ve tubulus distaliste zayıf yoğunlukta leptin immunoreaktivitesi. **2c.** Onosma nigricaula grubuna ait böbrek kesiti. Tubulus proksimalisde ve tubulus distaliste zayıf yoğunlukta leptin immunoreaktivitesi. Bar:50 µm.

Tartışma

Bu çalışma ile farelerde malathion'un neden olduğu oksidasyon parametreleri üzerine *Onosma nigricaula* (Boraginaceae)'den elde edilen bitkisel özüt uygulaması sonrasında böbrek dokusunun histolojik yapısı, immunohistokimyasal olarak leptin enziminin dokudaki lokalizasyonu, immunoreaktivitenin yoğunluğu ve şiddeti gruplar arasında incelendi.

Böbrek dokusunun tüm gruplarda yapılan histolojik incelemesinde elde edilen bulguların normal histolojik yapıyla uyumlu olduğu, klasik literatür bilgileriyle paralellik gösterdiği^{5,21} ve gruplar arasında dikkati çeken bir farkın olmadığı görülmüştür.

Pestisitlerin memeliler ile birlikte diğer canlı türlerinin çeşitli dokularında histopatolojik ve sitopatolojik değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Pestisitlerin en fazla zarar verdiği dokuların başında karaciğer ve böbrekler gelmektedir. Çünkü pestisitler karaciğerde metabolize edilmekte ve başlıca böbrek yolu ile vücuttan atılmaktadır^{22,23}. Organik fosforlu insektisitler içerisinde malathion, fazla kullanılan organik fosforlu bileşiklerdendir. Bitkilerin ilaç ham maddelerini içermesi ve aynı zamanda tedavideki önemlerinin her geçen gün anlaşılması nedeniyle son yıllarda bitkiler üzerlerinde yapılan araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Serbest radikallerin ciddi hastalıklara ve komplikasyonlara yol açması, bitkilerin antioksidan etkileri üzerine çalışmaların artmasına neden olmaktadır¹⁸. Serbest radikaller vücutta antioksidan savunma kapasitesini aştıkları zaman çeşitli bozukluklara yol açarak reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyarabilmektedirler^{24,26}. Bu çalışma *Onosma nigricaula* ve *Onosma*

nigricaula + malathion grubu dışındaki grupların böbrek korteksinde güçlü leptin immunoreaktivitesi tespit edildi. Tüm grupların böbrek medullasında ise leptin immunoreaktivitesinin zayıf olduğu görüldü. Kontrol grubu, mısır yağı grubu, serum fizyolojik grubu ve malathion grubundaki farelerin tubulus proksimalislerinde ve tubulus distalislerinde yoğun immunoreaktivite tespit edilmesine karşın, *Onosma nigricaula* ve *Onosma nigricaula* + malathion grubunda ise zayıf yoğunlukta immunoreaktiviteye rastlandı. Benzer şekilde, yapılan diğer çalışmalarda da böbrek iç korteksi ile dış korteks tubulus epitelinde leptin immunoreaktivitesinin görüldüğü, medullada ise boyamaya rastlanmadığı bildirilmiştir^{27,28}. Bu çalışma, *Onosma nigricaula* grubunda leptin aktivitesinin diğer gruplara göre azaldığı görüldü. Leptin ile günlük enerji alımı arasında zıt ilişki vardır. Vücut adipositesi, enerji dengesi ve insülin direncinin serum leptin konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir^{29,30}. Leptin ve leptin eksikliğinin etkilerinin araştırılması amacı ile fare ve obez insanlardan alınan kan örneklerin incelendiği çalışmalarda obez kişilerin kanlarında leptin seviyeleri yüksek bulunmuştur. Leptin seviyelerindeki yükselme yağ kitlesine orantılı olarak gelişmektedir³¹⁻³⁴. Ancak bu bitkinin vücuttaki yararlığını doğrulamak için daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada, yurdumuzda insektisit olarak yaygın kullanılan malathion'un fare böbreğinde leptin aktivitelerini etkilemediği, ancak *Onosma nigricaula*'nin leptin aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Bu bitki türleri ile ilgili daha önce çok az çalışmanın yapılmış olması çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Endemik bitki

türlerinin öneminin anlaşılması ve bu bitkilere sahip çıkılması açısından araştırma sonuçları dikkat çekici olarak değerlendirilmektedir. Bu sebeple *Onosma nigricaula*'nin antioksidan etkilerinin tam olarak açıklığa kavuşabilmesi için moleküler düzeyde yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

-Bu makale Ankara, Türkiye'de düzenlenen XII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde sunulmuştur; P:066, 27-30 Mayıs 2014.

-Bu makale 3. yazarın (Dinçer ERDAĞ) tezinden üretilmiştir.

-Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

- Dökmeci İ. Toksikoloji. 2. rd edn. Nobel Tıp Kitapevi. 2000; 95-99.
- Gasiewicz TA. Nitro compounds and related phenolic pesticides. In: Hayes WJ Jr.& Laws ER Jr ed. Hand book of pesticide toxicology. Academic Press, San Diego, CA. 1991; 3: 1191-269.
- Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G. Ellenhorn's Medical Toxicology; Diagnosis and Treatment of Human poisoning. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997;1614-1630.
- Larsam MM, Annabi AB, Rezg R. Effect of short-time malatyon administration on glucose homeostasis in Wistar rat. Pestic. Biochem. Phys. 2008; 92: 114-119.
- Buratti FM, D'Aniello A, Volpe MT. Malathion bioaktivasyon in the human liver: the contribution of different cytochrome p450 isoforms. Drug Metabolism And Disposition. 2005; 33: 295-302.
- Dere E, Bakır S, Atalay A. Malathion'un karaciğer, böbrek ve ince bağırsak alkalin fosfatase aktivitesi üzerine etkisi. Turkish Journal of Zoology. 1999; 23: 709-713.
- Friedman JM, Halaas JF. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395: 763-770.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M ve ark . Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994; 372: 425-431.
- Kaplan LM . Leptin, obesity and liver disease. Gastroenterology. 1998; 115: 997-1001.
- Kaçar C, Arı UÇ. Leptinin inek ve koyunlarda enerji metabolizması ve üreme fizyolojisi üzerine etkileri. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2007; 13 (2): 209-213.
- Prins JB, O Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. Clin Sci. 1997; 92: 3-11.
- Wilding J, Widdowson P, Williams G. Neurobiology. Br Med Bull. 1997; 53: 286-306.
- Murakami T, Yamashita T, Lida M ve ark. A short form of leptin receptor performs signal transduction. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 231: 26-29.
- Sharma K, Considine RV, Michael B ve ark. Plasma leptin is partly cleared by the kidney and is elevated in hemodialysis patients. Kidney Int. 1997, 51: 1980-1985.
- Özgen U, Miloğlu FD, Bulut G. Quantitative determination of shikonin derivatives with UV-Vis spectrophotometric methods in roots of *Onosma nigricaula*. Rev. Anal. Chem. 2011; 30: 59-63,.
- Kumar N, Gutpa KA, Prakash D ve ark . Hypoglycemic activity of *Onosma hispidum* (Ratanjot). International Journal of Diabetes in Developing Countries. 2010; 30: 213-216,.
- Rinner B, Kretschmer N, Knausz H ve ark. A petrol ether extract of the roots of *Onosma paniculatum* induces cell death in a caspase dependent manner. Journal of Ethnopharmacology. 2010; 129: 182-188,.
- Erdağ D. Malatyon verilen farelerde oksidasyon parametreleri üzerine *allium czezhauricum* (liliaceae), *lathyrus karsianus* (fabaceae) ve *onosma nigricaula* (boraginaceae)'den elde edilen ekstraktların etkileri. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012.
- Tru LD: Principles of immunohistochemistry. Editör: True L.D. Atlas of Diagnostic immunohistopathology. Newyork Press, 1990; 1-31, USA.
- Crossmonn G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. Anat Rec, 1937; 69: 33-38.
- Zık B. Uriner Sistem. In, Özer A (Ed): Veteriner Özel Histoloji. II. Baskı. Nobel Yayın, 2010; 197-218.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A ve ark. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: The protective effect of vitamin E. Toxicology. 2004; 3: 227-235.
- Sulak O, Altuntaş I, Karahan N ve ark. Nephrotoxicity in rats induced by organophosphate insecticide methidathion and ameliorating effects of vitamins E and C. Pestic. Biochem. Phys. 2005; 83: 21-28.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 1982; 47: 412-426.
- Gluszczak L, Miron DDS, Moraes BS ve ark. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia Quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 2007; 146: 519-524.
- Keramati V, Jamili S, Ramin M. Effect of Diazinon on Catalase Antioxidant Enzyme Activity in Liver Tissue of *Rutilus rutilus*. Journal of Fisheries and Aquatic Science. 2010; 5:368-367.
- Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Brossard G ve ark. Characterization and localization of leptin receptors in the rat kidney. FEBS Lett. 1997; 404:185-191.
- Hama H, Saito A, Takeda T ve ark. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. Endocrinology. 2004; 145:3935-3940.
- Rosenbaum M, Libel RL, Hirsch J. Obesity. N Engl J Med. 1997; 337:396-407.
- Ruige JB, Dekker JM, Blum WF. Leptin and variables of body adiposity, energy balance and insulin resistance in a population based study. Diabetes Care. 1999; 22:1097-1104,.
- Farooqi S, Rau H, Whitehead J. Ob gene mutations and obesity. Proc Nutr Soc. 1998, 57: 471-475.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature. 1997, 387: 903-908.
- O'Rahilly S. Life without leptin. Nature. 1998, 392: 330-331.
- Polito A, Fabbri A, Luzzi A: Bazal metabolic rate in anorexia nervosa : relation to Body composition and leptin concentrations. Am J Clin Nutr. 2000, 71:1495-1502.