



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DELTAMETRİN VE THİAKLOPRİD İNSEKTİSİT
KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER FİBROBLASTLARINDA
OKSİDATİF STRES POTANSİYELİNİN VE HÜCRE
CANLILIĞINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ALPEREN KARABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**DELTAMETRİN VE THIAKLOPRİD İNSEKTİSİT
KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER FİBROBLASTLARINDA
OKSİDATİF STRES POTANSİYELİNİN VE HÜCRE
CANLILIĞINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ALPEREN KARABIYIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Alperen KARABIYIK tarafından hazırlanan “**DELTAMETRİN VE THIAKLOPRİD İNSEKTİSİT KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER FİBROBLASTLARINDA OKSİDATİF STRES POTANSİYELİNİN VE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 03.09.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

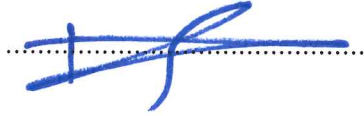
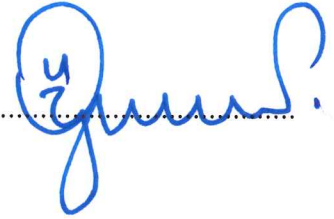
Jüri Üyeleri

Üye
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Ordu Üniversitesi

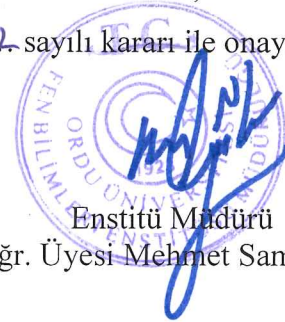
Üye
Prof. Dr. Öznur E. AKÇİN
Moleküler Biyoloji ve Genetik,
Ordu Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Birsen AYDIN
Biyoloji, Amasya Üniversitesi

İmza



13/09/2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 13/09/2019 tarih ve 2019 / 622 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ALPEREN KARABIYIK

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün AR-1669 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

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

ÖZET

DELTAMETRİN VE THİAKLOPRİD İNSEKTİSİT KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER FİBROBLASTLARINDA OKSİDATİF STRES POTANSİYELİNİN VE HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ALPEREN KARABIYIK

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 72 SAYFA

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

Deltametrin (DEL) ve thiakloprid (THİA) karışımı, tarımda yaygın olarak kullanılan etkili bir insektisit formülasyonudur. Bu tip insektisitlerin; heterozigotluk kaybı, gen mutasyonları ve akciğer kanserinin gelişiminde potansiyel moleküler biyogöstergelerden olan düzensiz promotör gen metilasyonu gibi moleküler değişimlere yol açabildiği ileri sürülmektedir. Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* araştırmalarda DEL'in reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşumunu artırdığı ve antioksidan enzim seviyelerinin düşmesine yol açtığı bildirilmiştir. THİA'in de dahil olduğu neonikotinoit sınıfından insektisitlerin zebra balığı, fare ve sıçanda oksidatif strese ve DNA hasarına sebebiyet verdiği rapor edilmiştir.

Reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengenin bozulduğu oksidatif strese maruz kalan hücrelerde DNA ve genom etkilenmektedir, bu şekilde hücre DNA'sının yapısını değiştirebilen ROS genotoksititeyi tetikleyerek kanser öncüsü olarak iş görür. Bu şekilde etkilenmiş hücrede, hücre bölünmesinin ve yeni hücrelerde normal kromozom dağılımının yanı sıra DNA kırıklarının sebep olduğu kromozom morfoloji değişimlerinin önlenemediği durumlarda; genomik kararsızlık, neoplastik transformasyon ve kanser gelişimi gözlenebilmektedir.

Çalışmamızda kullanılması planlanan karışım halindeki DEL ve THİA insektisit kombinasyonunun insan akciğer fibroblast hücrelerinde (hTERT WHTBF-6) 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları sonucu hücre canlılığına ve oksidatif strese etkisi incelenmiştir. İsektisit karışımının sitotoksik etkisi, canlı ve proliferen hücrelerin tespitini sağlayan, mitokondriyal aktivite bazlı MTT testi ile, oksidatif stres üzerindeki etkileri ise hücrelerin redükte glutatyon (GSH) seviyeleri ve hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artıran lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir.

İsektisit karışımının deneyde kullanılacak dozlarının belirlenmesi ve hTERT WHTBF-6 hücre hattı için IC₅₀ değerinin belirlenmesi amacıyla 0.50+7.5, 1.25+18.75, 2.50+37.5, 5+75, 12.5+187.5, 25+375, 50+750, 100+1500, 150+2250, 200+3000 µM'lık (sırasıyla DEL+THİA) 10 dozluk bir skala ile mtt testi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda, 72 saat uygulamada IC₅₀ değerleri deltametrin için 32 µM ve thiakloprid için 481 µM olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu testler sonucu belirlenen insektisit karışımının 2.50+37.5, 5+75, 12.5+187.5, 25+375 µM'lık 4 dozu mtt, gsh ve mda testlerinde kullanılmıştır. Bu testler WHTBF-6 insan

akciğer fibroblastlarında S9 karaciğer fraksiyonunun varlığında ve yokluğunda uygulanmıştır. Deney verileri, deltametrin ve thiaklopid insektisit karışımlarının WHTBF-6 hücre hattında ve kullanılan deney şartlarında sitotoksik etki gösterdiğini ayrıca insektisit karışımının malondialdehit miktarını artırdığını ve glutatyon seviyesini düşürdüğünü, böylece hücrelerin oksidatif strese maruz kaldığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Deltametrin-Thiaklopid Karışımı, Hücre Canlılığı, İnsan Akciğer Fibroblast, Oksidatif Stres

ABSTRACT

DETERMINING OF OXIDATIVE STRESS POTENTIAL AND EFFECT ON CELL VIABILITY OF DELTAMETHRIN AND THIACTOPRID INSECTICIDES IN HUMAN LUNG FIBROBLASTS

ALPEREN KARABIYIK

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MASTER THESIS, 72 PAGES

SUPERVISOR: Assoc. Prof. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

The mixture of deltamethrin (DEL) and thiacloprid (THIA) is an effective insecticide formulation commonly used in agriculture. It's been claimed that these kinds of insecticide can lead to molecular changes such as loss of heterozygosity, gene mutations, and irregular gene methylation of the promoter, a potential molecular biomarker in the development of lung cancer. In addition, it has been reported that *in vitro*, and *in vivo* studies, DEL increases the formation of reactive oxygen species and free radicals and causes decreasing on antioxidant enzyme levels. Insecticides, the Neonicotinoid class that Thiacloprid is involved in, have been reported to cause oxidative stress and DNA damage in zebrafish, mice, and rats.

In the cells, exposed to oxidative stress where the balance is disrupted between reactive oxygen species and free radicals and antioxidants, DNA and genome are affected, thereby ROS acts as a cancer precursor by triggering genotoxicity, which can alter the structure of the DNA. In such an affected cell, in case cell division and normal chromosome distribution in new cells as well as chromosome morphology changes caused by DNA fractures cannot be prevented, genomic instability, neoplastic transformation, and cancer development can be observed.

The effects on cell viability and oxidative stress of DEL and THIA insecticide combination which are planned to be used in our study were investigated after 24, 48, and 72 hours of administration in human lung fibroblast cells (hTERT WHTBF-6). While the effects of the insecticide mixture on oxidative stress were determined by measuring the reduced glutathione (GSH) levels of the cells and the malondialdehyde (MDA) levels, a product of lipid peroxidation, which increased the formation of reactive oxygen species in the cells, the cytotoxic effect of the insecticide mixture was determined by the mitochondrial activity-based MTT test, which enables the detection of viable and proliferating cells.

In order to determine the doses of the insecticide mixture to be used in the experiments and the IC50 value for the hTERT WHTBF-6 cell line in 72 hours of administration, the MTT tests were performed with a 10-dose scale, 0.50+7.5, 1.25+18.75, 2.50+37.5, 5+75, 12.5+187.5, 25+375, 50+750, 100+1500, 150+2250, 200+3000 µM (DEL + THIA, respectively). As a result of these experiments, IC50

values of 72 hours of exposure were specified as 32 μM for DEL and 481 μM for THIA. Besides, MTT, GSH, and MDA methods were also carried out with 4 doses of the insecticide mixture (2.50 + 37.5, 5 + 75, 12.5 + 187.5, 25 + 375 μM) determined by applying MTT test. These three tests had been performed in the presence and absence of S9 liver fraction in WHTBF-6 human lung fibroblasts.

Experimental data showed that Deltamethrin+Thiacloprid insecticide mixtures exhibited cytotoxic effect in WHTBF-6 cell line under the experimental conditions used and that also the insecticide mixture increased the amount of malondialdehyde and decreased the level of glutathione so that the cells were exposed to oxidative stress.

Keywords: Cell Viability, Deltamethrin-Thiacloprid Mixture, Human Lung Fibroblast, Oxidative Stress

TEŐEKKÖR

Tez konumun belirlenmesi, yűrűtűlmesi ve yazımı esnasında baŐta danıŐman hocam Sayın Doç. Dr. Vedat ŐEKEROĐLU'na, gűler yűzű ve laboratuvardaki alıŐmalarda yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Zűlal ATLI ŐEKEROĐLU'na, tez yazım aŐamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili babam Ergűn KARABIYIK ve sevgili annem Hűsne KARABIYIK'a teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
ÇİZELGE LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Pestisitlerin Toksik Etkileri.....	5
2.2 Böceklerle Mücadelede Kullanılan İsektisitler.....	6
2.2.1 Piretroit Grubu İsektisitler.....	7
2.2.1.1 Piretroitlerin Genel Özellikleri.....	7
2.2.1.2 Piretroitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri.....	7
2.2.1.3 Deltametrin.....	8
2.2.1.4 Deltametrinin Vücuda Emilimi ve Metabolizması.....	9
2.2.1.5 Deltametrinin Toksik Etkileri.....	10
2.2.2 Neonikotinoit Grubu İsektisitler.....	11
2.2.2.1 Neonikotinoitlerin Genel Özellikleri.....	11
2.2.2.2 Neonikotinoitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri.....	12
2.2.2.3 Thiakloprid.....	12
2.2.2.4 Thiaklopridin Vücuda Emilimi ve Metabolizması.....	13
2.2.2.5 Thiaklopridin Toksik Etkileri.....	14
2.3 Oksitatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri.....	15
2.4 Lipit Peroksidasyonu.....	16
2.5 Antioksidan.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Kullanılan Cihazlar.....	20
3.1.1 Karbondioksit (CO ₂)'li İnkübatör.....	20
3.1.2 Hücre Sayım Cihazı.....	20
3.1.3 Biyogüvenlik Kabini.....	20
3.1.4 Santrifüj.....	20
3.1.5 Su Banyosu.....	20
3.1.6 Hassas Terazı.....	21
3.1.7 Vorteks Karıştırıcı.....	21
3.1.8 İnvrt Mikroskop.....	21
3.1.7 Mikroplaka Eliza Okuyucu.....	21
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	21
3.2.1 İsektisitler.....	21
3.2.1.1 Deltametrin (SIGMA).....	21
3.2.1.2 Thiakloprid (SIGMA).....	22
3.2.2 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK).....	23
3.2.3 Attachment Faktör (AF) (GIBCO).....	23
3.2.4 Ultra Saline (LONZA).....	23
3.2.5 Tripsin-EDTA (LONZA).....	24
3.2.6 Tripsin Nötralize Solüsyonu (TNS) (LONZA).....	24

3.2.7 Sıvı Azot (LN)	24
3.2.8 Trypan Mavisi (GIBCO)	24
3.2.9 Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO)	24
3.2.10. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F-12) (ATCC)	24
3.3 Yöntemler	25
3.3.1 Hücre Kültürü	25
3.3.2 Hücre Hattının Çözülmesi	25
3.3.3 Hücrelerin Pasajlanması	25
3.3.4 Hücrelerin Dondurulması	26
3.3.5 Hücre Sayımı	26
3.3.6 Deney Dozları ve IC ₅₀ Belirlenmesi	26
3.3.7 Deney Planı ve Grupları	27
3.3.8 MTT Testi	28
3.3.9 GSH (Glutasyon) Testi	29
3.3.10 MDA (Lipit Peroksidasyon) Testi	29
3.3.11 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1 Deney Dozları ve IC ₅₀ 'nin Belirlendiği MTT Testi Sonuçları	31
4.1.1 IC ₅₀ 'ye Göre Belirlenen Dozlar ile Yapılan MTT Testi Sonuçları	39
4.2 GSH Testi Sonuçları	45
4.3 MDA Testi Sonuçları	49
4.4 Sitotoksikite ve Oksidatif Stres	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
6. KAYNAKÇA	62
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1** Deltametrin (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü ... 22
- Şekil 3.2** Thiakloprid (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü.... 23
- Şekil 4.1** İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)..... 34
- Şekil 4.2** İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 48 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)..... 35
- Şekil 4.3** İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 72 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)..... 36
- Şekil 4.4** 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarında Kontrole Göre Hücre Canlılığının (%) İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi..... 36
- Şekil 4.5** 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri 37
- Şekil 4.6** 72 Saatlik Uygulama Sonrası İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Sitotoksisite Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$) 38
- Şekil 4.7** WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (24 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$) 42
- Şekil 4.8** WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (48 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$) 43
- Şekil 4.9** WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (72 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$) 43
- Şekil 4.10** 24, 48, 72 Saatlik Uygulamaların S9'lu ve S9'suz Olarak Kontrole Göre GSH Seviyelerinin İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$). 47
- Şekil 4.11** 24, 48, 72 Saatlik Uygulamaların S9'lu ve S9'suz Olarak Kontrole Göre MDA Seviyelerinin İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)..... 51

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 IC ₅₀ Değerini Bulmak İçin Hazırlanan Deltametrin / Thiaklopid Dozları	27
Çizelge 3.2 Deltametrin / Thiaklopid IC ₅₀ 'ye Göre Belirlenen Dozlar	28
Çizelge 4.1 24 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	31
Çizelge 4.2 48 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	32
Çizelge 4.3 72 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	32
Çizelge 4.4 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri	33
Çizelge 4.5 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 48 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri	34
Çizelge 4.6 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 72 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri	35
Çizelge 4.7 24, 48 ve 72 Saat'lik Uygulamaların Hücre Canlılık Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri	37
Çizelge 4.8 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (24 saat)	40
Çizelge 4.9 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (48 saat)	40
Çizelge 4.10 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (72 Saat)	41
Çizelge 4.11 S9'lu ve S9'suz 24, 48 ve 72 saatlik Uygulamalardaki Hücre Canlılığı Değerleri	41
Çizelge 4.12 S9'lu ve S9'suz 24, 48 ve 72 Saat'lik Uygulamaların Hücre Canlılık Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri	42
Çizelge 4.13 24 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	45
Çizelge 4.14 48 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	46
Çizelge 4.15 72 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	46
Çizelge 4.16 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamalarda S9'suz ve S9'lu Test Sonucu Hesaplanan GSH Değerleri	47
Çizelge 4.17 24 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	49
Çizelge 4.18 48 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	49
Çizelge 4.19 72 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri	50
Çizelge 4.20 24, 48, 72 Saatlik Uygulamalarda S9'suz ve S9'lu Hesaplamalar Sonucu MDA Değerleri	50

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Attachment Faktör: (Bağlantı Faktörü)
CAs	: Kromozom Sapmaları
DEL	: Deltametrin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DTNB	: 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EPA	: ABD Çevre Koruma Ajansı
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Glutation Disülfid
HDOPE	: Hidroperoksikotadekadenoik Asit
HNE	: Hidroksinonenal
IC₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
LD₅₀	: Test Edilen Ortamda Bulunan Popülasyonun Yarısının Ölümüne Yol Açması İçin Gerekli Doz Miktarı.
LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
MI	: Mitotik İndeksi (Bir Hücre Populasyonunda Mitoz Bölünme Yapan Hücrelerin Tüm Hücrelere Oranı)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
nAChR	: Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri
NAPDH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OD	: Optik Density: (Optik Yoğunluk)
PBS	: Phosphate buffered saline
PBS	: Phosphate Buffered Saline: (Fosfat Tamponlu Salin)
PMN	: Polimorfonükleer Lökositler
ROS	: Reactive Oxygen Species: (Reaktif Oksijen Türleri)
S9	: Karaciğer Fiksasyonu
TBA	: Thiobarbitürik Asit
THIA	: Thiaklopid
TNS	: Tripsin Nötralize Solüsyonu
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WHTBF-6	: İnsan Akciğer Fibroblast Hücre Hattı

1. GİRİŞ

Pestisit terimi kısaca ‘pest’ (haşarat) adı verilen zararlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelir ve şu şekilde tanımlanabilir: İnsan, hayvan ve bitki üzerinde, çevresinde bulunan veya yaşayan, ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerini azaltan, hasara uğratan zararlıları öldürmek için kullanılan maddelerdir. Bu zararlılar çeşitli hastalıkları taşıyan parazitler, tarım ve bitki zararlısı böcekler, yabancı ot ve mantarlar, insan, hayvan, çevre ve barınaklardaki sinek, bit, pire, kene, uyuz, hamam böceği gibi uçan ve yürüyen canlılardır (Kaya ve ark., 2002).

Zararlı böcekleri kontrol etmek ve zararlı otları yok etmek için yaygın olarak kullanılan pestisitler, çevremizde biriken her yerde bulunan kirletici maddelerdir ve dolayısıyla insanlar bu pestisitlere kaçınılmaz şekilde maruz kalırlar. Bazı pestisitler yüksek derecede toksiktir, biyolojik olarak bozunmaz ve çevrede uzun süre kalır. Kullanılan pestisitlerin temel sınıfları organoklorinler, organofosfatlar, neonikotinoitler, karbamatlar ve piretroitlerdir. Bu insan yapımı kimyasalların bazılarının insan ve vahşi yaşam popülasyonunun sağlığını etkilediği konusunda giderek artan endişeler bulunmaktadır. Birçoğu Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) uyarınca kanserojen olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen, mekanizmalarının anlaşılması hala yetersizdir (Ghisari ve ark., 2015). Geçtiğimiz birkaç yılda moleküler biyobelirteçler, bu ilişkilerin ilgili maruz kalma seviyelerinde daha iyi kantitatif tahminler yapmak için böcek ilaçları da dahil olmak üzere, tarımsal çevre kirletici maddelerle olan ilişkilerini belirtmek için yaygın olarak kullanılmıştır (Anwar, 1997). Bunlar, çeşitli streslere karşı organizmaların çeşitli enzimleri, DNA çalışmalarını ve biyokimyasal yönlerini içermiştir. Son yıllarda, hızlı bir toksikoproteomik tabanlı teknolojilerin geliştirilmesi, protein ekspresyonu ve olumsuz çevresel zorluklara cevap veren modifikasyonlarda yapılan değişikliklerin yerel analizine katkıda bulunmuştur (Wetmore ve Merrick, 2004). Çalışmalar, toksik kimyasal maruziyetten kaynaklanan protein değişikliklerini ve biyobelirteç tanımlamasını profillemeye yetenekleri için çeşitli toksikoproteomik teknolojilerin uygulanabileceğine dair güçlü kanıtlar sağlamıştır (Merrick, 2004; George ve Shukla, 2011).

Günümüzde pestisit maddelerinin yaygın kullanımı, bitkilerin ve insanların istenmeyen zararlılardan korunmasını büyük ölçüde garanti etmektedir. Bununla birlikte, pestisitlere maruz kalma, kanserojen, nörodejeneratif hastalıklar, immünolojik hastalıklar, endokrin sistem üzerindeki etkiler vb. gibi çeşitli insan sağlığı etkilerinin geliştirilmesinde rol oynayabilir (Alavanja ve ark., 2013). Her ne kadar pestisit maruziyetini olumsuz sağlık etkileriyle ilişkilendiren çok sayıda çalışma yayınlanmış olsada, epidemiyolojik çalışmalar birçok sınırlamadan ve mevcut verilerin heterojenliğinden muzdarip olduğundan, pestisit maruziyeti ve kronik hastalıklar arasındaki nedensel ilişki konusunda hala büyük miktarda bir belirsizlik bulunmaktadır. (Ntzani ve ark., 2013).

Böceklere karşı kullanılan insektisitler, mantar ve küflere karşı kullanılan fungusitler, yumuşakçalara karşı kullanılan Mollussisitler, yabancı otlara karşı kullanılan Herbisitler, nematodlara karşı kullanılan Nematisitler, kemirgenlere karşı kullanılan Rodentisitler, bitki büyüme düzenleyicisi kimyasallar ve diğer pek çok kimyasallar pestisit grubu içerisinde yer almaktadır. Böcekleri öldürmek için kullanılan maddelerin genel adına insektisit denir (IUPAC, 2018). Bu maddeler, larvaları öldüren Larvisitler, yumurtaları öldüren Ovisitleri de kapsar. Tıp, endüstri ve tarımda yaygın olarak kullanılan insektisitlerin hemen hemen hepsi ekosistemde önemli bir etki yapabilir, hayvanlara ve insanlara karşı toksik etkileri olabilir ve besin ağı (zinciri) içerisinde belirli türlerde yüksek oranda birikme kapasitesine sahiptirler (Emden ve Peakall, 1996).

Bu insektisitlerin çoğunluğu kontak yoluyla etkisini gösterir. İnsektisitlerin etki şekli bir insektisit in haşereyi nasıl öldürdüğünü ya da etkisiz hale getirdiğini açıklayan mekanizmadır. Pek çok bilim insanı insektisitleri etki şekline göre sınıflandırmaktadır. Bu mekanizmalar ayrıca bir insektisit in hangi hayvanları fizyolojik olarak etkileyeceğini de bize gösterir. İdeal bir pestisit hedef organizmaya (target organizma) ölümcül olmalı, ancak hedef olmayan organizmalara (non-target türlere) özellikle insana zarar vermemelidir. Ne yazık ki gerçekte pestisitler hedef olmayan organizmalara da zarar vermektedir (Aktar ve ark., 2009). Tarım alanlarındaki yoğun kullanım pestisitlerin ve türevlerinin doğada birikimine ve doğal kaynakları kontamine etmesine sebep olmaktadır. Bu birikim ve kontaminasyonda

insan ve diğer hayvanların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. (Ghisari ve ark., 2015).

2. GENEL BİLGİLER

Pestisitlerin halk sağlığı ve tarım programlarında yaygın olarak kullanılması, ciddi çevre kirliliği, ciddi akut ve kronik insan zehirlenme vakaları dahil olmak üzere potansiyel sağlık tehlikelerine neden olmuştur (Abdollahi ve ark., 2003). Yeni, daha toksik ve hızla yayılan pestisitlerin çevreye sokulması, potansiyel tehlikelerinin insan sağlığı açısından doğru bir şekilde tanımlanmasını gerekli kılmıştır. Bu gibi pestisitler ekosistemin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir ve bazıları çok karardlıdır. Birkaç vakada, toksisite biyotransformasyondan sonrasında kalır. Tehlikenin kapsamı, tortunun miktarına, toksisitesine ve diğer birkaç faktöre bağlıdır. Ayrıca, kümülatif etki nedeniyle, kalıntı olmayan hedef organizmalarda tortu seviyeleri artar. İnsan numunelerinin kalıntı analizi serum, yağ dokusu, anne sütün, idrarda pestisit seviyelerinde artış eğilimi olduğunu göstermiştir. Vücudumuzdaki toksik kalıntıların biyolojik birikiminden kaynaklanan potansiyel tehlikelerle ilgili artan bir endişe vardır. Pestisit zehirlenmesi, gelişmekte olan üçüncü dünya ülkelerinde morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleri olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, her yıl 3 milyon şiddetli zehirlenme vakası ve 22.000 ölüm (zehirlenmelerin çoğunluğu) meydana gelir; Ortaya çıkan ölümlerin %99'u üçüncü dünya ülkelerinde gerçekleşmiştir. Pestisitlerin ayrı ayrı kullanımından kaynaklanan istenmeyen yan etkiler yaygındır. Pestisitler insanlarda hem biyokimyasal hem de fizyolojik fonksiyonları bozar. Yapılan birçok araştırmaya rağmen, deney hayvanlarını kullanarak yapılan çalışmalardan, pestisitlere kronik maruz kalmanın insanları ne kadar etkileyeceği tam olarak belirlenememiştir. Zehirlenmeyi önlemek için zehirlenmeyi destekleyen faktörlerin iyi tanınması gerekir. Son zamanlarda, pestisitlerin lipit peroksidasyonu ve farklı konakçıların oksidatif strese bağlı parametreleri üzerindeki etkisi ilgi kaynağı olmuştur. Pestisit maruziyeti sonrasında enzim aktivitelerindeki ve glutatyon (GSH) redoks sistemindeki önemli değişikliklerin ortaya çıkabileceği belirlenmiştir (Banerjee ve ark., 2001). Birçok pestisit bağışıklık sisteminin bozulmasına ya da baskılanmasına neden olduğu bilinmektedir ve bu bilgi doğrultusunda araştırmacılar son yıllarda oksidatif strese bağlı immünotoksisite üzerine daha çok eğilim göstermişlerdir (Ray ve ark., 1997; Banarjee ve ark., 2001).

Yakın zamanlarda piretroit grubu bir insektisit olan deltametrin ve neonikotinoit grubu bir insektisit olan thiakloprid karıştırılarak yeni bir pestisit formülü piyasaya sürülmüştür. Başta deltametrin olmak üzere bu iki pestisitinin ayrı ayrı etki mekanizmalarını ve toksik etkilerini içeren *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Ancak birlikte kullanımları halinde etkilerinin araştırıldığı *in vitro* sitotoksik ve genotoksik çalışma az sayıdadır.

2.1 Pestisitlerin Toksik Etkileri

Pestisitlerin mitotik indeksi azalttığı ve kromozom aberasyonlarını arttırdığı yapılan birçok araştırmada değerlendirilmiştir. Pestisitlerin hücrelerde çeşitli sitotoksik etkiler oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Pestisitler, günümüzde tarımsal arazilerden yüksek verim elde edebilmek amacıyla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak; çevre ve doğal dengeyi olumsuz yönde etkilemesi, ürünlerde, toprakta, suda ve havada kalıntı bırakması, hastalık, zararlı ve yabancı otlarda dayanıklılık meydana getirmesi ve oral, dermal ve inhalasyon yollarıyla vücuda alınarak insan sağlığını tehdit etmesi gibi birçok istenmeyen etkilere yol açmaktadır (Şekeroğlu, 2010). Toksik maddelere maruz kalmalar çoğunlukla solunum deri ve gözlerin doğrudan temas ve/veya sindirim yoluyla gerçekleşir, bunlardan solunum, vücuda girişin en önemli yoludur ve ilişkili ölümleri en sık bildirilen maruz kalma tipidir. Gazlar ve buharlar en sık solunan maddelerdir, bununla beraber sıvılar ve katılar da küçük parçacıklı duman, basınçlı gaz (sprey) veya toz şeklinde solunabilir. Akciğerler toksisite tarafından öncelikli olarak etkilenir (Newman, 2004; Eldridge, 2008). Çeşitli pestisitlere solunum yoluyla maruz kalmanın akciğer kanserine yol açabileceği belirtilmektedir (Gold ve ark., 1997). Zirai işlemlerle ilişkili pestisitlere maruz kalma solunum semptomlarının risk artışıyla alakalıdır (Lovász ve Zeic, 2013). Ayrıca birden çok kimyasal maddenin karışımı ile hazırlanan pestisit preparatlarından dolayı, insanlar sadece bir pestisite değil birden çok pestisit çeşidine aynı anda maruz kalmakta ve bu nedenle oluşabilecek hasar miktarı da artabilmektedir (Demsia ve ark., 2007; Şekeroğlu, 2010). Genellikle iki veya daha fazla pestisit içeren karışımlara maruz kalan organizmalardaki toksik etkinin, pestisitlere tek başlarına maruz kalındığında gözlenen toksik etkiden daha fazla ve daha ciddi sonuçlara yol açabildiği belirtilmektedir. Her bir pestisitinin tek başına sahip olduğu potansiyele bağlı olarak

toksik etkinin diğlerinden bağımsız ortaya çıkması bu etkilerin birbiri üzerine eklenecek toplam toksisitenin artış göstermesine yol açabilmektedir. Bu şekilde pestisitler karışım halinde kullanıldıklarında, biri diğlerinin toksik etkisinde artışa neden olacak şekilde sinerjistik etkileşim meydana getirebilir ve toplam toksik etkide bir artışa sebep olabilmektedir (Şekeroğlu, 2010; Şekeroğlu ve ark., 2013).

İnsektisitlerin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda; lipit peroksidasyonunu dolayısıyla malondialdehit ve benzerlerinin üretimini artırdığını ayrıca doku hasarı ve hücre toksisitesi varlığının tespitinde kullanılan laktat dehidrojenaz salınımını artırdığını ve organizmayı oksidatif hasardan koruyan glutatyon peroksidaz aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarına aracılık edebileceği ve tümör oluşumuna ve kanser gelişimine yol açabileceği kanıtlarla desteklenmiştir (Bagchi ve ark., 1995). Bu çalışmalardan elde edilen kanıtlar, ksenobiyotikler ve klorlu bileşikler gibi çevresel ajanların ROS aracılı toksisite yoluyla hücre hasarını önemli başlatıcıları olduğuyula ilgilidir (Galaris ve ark., 2008). Artmış ROS üretimi ve antioksidan savunma kapasitesinin azalması oksidatif dengeyi bozabilir ve lipitler, proteinler ve DNA'yı içeren hücrenin tüm bileşenlerinin hasarıyla sonuçlanabilir (Mostafalou ve Abdollahi, 2013). Bazı pestisitlerin nükleotit değişiklikleri veya kayıplarına böylece de DNA tek zincir kırıklarına yola açabilecek ROS oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (Lioi ve ark., 1998; Banerjee ve ark., 2001; Giray ve ark., 2001; Muniz ve ark., 2008).

Piretroit grubu bir insektisit olan DEL ve neonikotinoit grubu bir insektisit olan THIA karışımının piyasaya sürülmüş ve kullanıma geçmiş özel bir formülasyonu, karışım halindeki pestisitlere bir örnektir.

2.2 Böceklerle Mücadelede Kullanılan İnsektisitler

Organoklorinler, organofosfatlar, karbamatlar ve piretroitler grubu insektisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı böcek türlerinin organofosfatlı ve organoklorinli insektisitlere karşı direnç geliştirmelerinden dolayı bu insektisit türlerinin kullanımının azalması ile beraber neonikotinoit ve piretroitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Kovganko ve Kashkan, 2004; Çakır ve Yamanel, 2005). Çalışmamızda test maddesi olarak kullandığımız deltametrin piretroit, thiakloprid ise neonikotinoit grubu insektisitlerdir.

2.2.1 Piretroit Grubu İsektisitler

2.2.1.1 Piretroitlerin Genel Özellikleri

Piretroit insektisitler, krizantem çiçeğinde bulunan doğal piretrinlerin sentetik analoglarıdır (Gassner ve ark., 1997a; Kumar ve ark., 2015). Piretroitler yapısal farklılıklara ve toksikolojik ve nörofizyolojik eylemlere dayanarak iki sınıfa ayrılmıştır. Tip I piretroitler (alletrin, permethrin, tetrametrin, piretrinler) alfa-siyano grubu içermeyen piretroit esterleridir. Tip II piretroitler (deltametrin, cypermethrin) ise alfa-siyano grubu içerirler (Barlow ve ark., 2001). A-siyano süstitüentinin varlığı veya yokluğu zehirlenme sendromu tipini belirler. Siyano olmayan (tip I) bileşikler, artan reaktiviteden tüm vücut titremesine kadar ilerleyen kemirgenlerde semptomlar üretir. Siyano piretroitleri (tip II) tükürük salgılaması, koreotetoz ve kronik nöbetlerden oluşan bir sendrom oluşturur (Kumar ve ark., 2105)

Sentetik piretroitler, daha iyi performans özelliklerine sahip piretrum benzeri yapılara sahip benzersiz bir insektisitler grubunu oluşturur ve küresel olarak kullanılan insektisitlerin %30'undan fazlasını kapsar (Prasanthi ve ark., 2005).

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) 'nın konut ve tarımsal kullanımlarda organofosfat insektisitlerin kullanımını azaltma kararı, piretrin ve piretroit insektisitlerin kullanımını arttırmıştır (Power ve Sudakin, 2007). Her ne kadar memeliler bu pestisitleri hızlı bir şekilde hidrolize edebilirlerse de özellikle organizmalar kronik olarak böcek ilaçlarına maruz kaldıklarında önemli bir toksisite göstermiştir. Bu bağlamda, çeşitli çalışmalar piretroit maruziyetinin çeşitli organlardan (yani beyin, eritrosit, lökositler, vb.) hücrelerde oksidatif hasar artışına neden olabileceğini göstermiştir (Bradberry ve ark., 2005; Nasuti ve ark., 2007). Memelilerde piretroit toksisitesi ile ilgili mekanizmalardan biri, oksidatif stresi artırma kapasiteleridir.

2.2.1.2 Piretroitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri

Piretroitler diğer böcek öldürücü sınıflarına göre daha hidrofobiktir ve bu özellik etki bölgesinin biyolojik zarda olduğunu gösterir (Michelangeli ve ark., 1990). Aslında, piretroitler için ana hedef bölge, nöronal zardaki gerilime bağlı sodyum kanalı olarak tanımlanır (Soderlund ve Bloomquist, 1989). Mevcut veriler hem Tip I hem de Tip II piretroitlerin, ayrı ayrı kanalların açılıp kapanmasının kinetiğini yavaşlatarak sodyum kanallarında güçlü ve stereoselektif olarak etki ettiğini göstermektedir. GABAA reseptörünün inhibisyonu, Tip II piretroitler için önerilen ek bir mekanizmadır

(Narahashi, 1991). Ek olarak, tip II sendromu merkezi sinir sistemini etkilerken, tip I periferik sinirleri içerir (Lawrence ve Casida, 1982).

Her ne kadar tip I ve II tedavisinin etkisi hayvanlarda farklı semptomlar üretse de asıl etkileri sodyum ve klorür kanallarıdır. Bu böcek öldürücüler, böceklere, memelilere göre 2250 kat daha toksik sonuç verir (Bradberry ve ark., 2005). Bu etki daha yüksek sodyum kanallarının duyarlılığından, düşük vücut ağırlığından ve sıcaklıktan kaynaklanmaktadır. Memeliler bu böcek öldürücülere karşı daha dirençli olsalar bile, bu pestisitlerin tarımda ve iç haşere kontrolü için yaygın olarak kullanılması, hedef dışı organizmalara da zarar verebilir (Shafer ve ark., 2005). ABD popülasyonundan ve İtalya'nın farklı bölgelerinden gelen veriler, insanların idrarda ölçülebilir pestisit metabolit seviyelerine sahip olduklarını göstermektedir (Mage ve ark., 2004)

Böceklerde piretroitlerin toksisitesi, sinir zarlarındaki depolarize edici etkileriyle doğrudan ilişkilidir. Çoğu piretroit insektisiti en az iki izomer olarak bulunurken, deltametrin tek bir izomer olarak pazarlanır (Kumar ve ark., 2015).

2.2.1.3 Deltametrin

DEL; süs bitkilerinde, sebzelerde, pek çok meyvede, tahıllarda, nohutta, ayçiçeğinde, pamukta ve diğer pek çok tarla bitkisinde görülen pek çok böcek türü ile kimyasal mücadele için kullanılan α -siyano tip 2 sentetik piretroit tipi bir insektisittir (Barlow ve ark., 2001; Şekeroğlu, 2010). Birçok çalışma DEL'in memelilerde genotoksik, immünotoksik ve karsinojenik etkisinin olduğunu göstermiştir.

Deltametrin, 1974'te Elliott tarafından sentezlenen fotostatik bir piretroitdir (Qiao ve ark., 2005). Kimyasal açılımı α -siyano-3-fenoksibenzil-(1R, S)- cis, trans -3- (2,2-dibromovinil) -2,2-dimetilsiklopropan karboksilatıdır. Düşük konsantrasyonlarda yüksek etkileri, kolay parçalanmaları ve kuşlar ve memelilere düşük toksisite göstermesi deltametrinin temel avantajlarıdır (Kumar ve ark., 2015). Deltametrin pamuk, mısır, hububat ürünleri, soya fasulyesi ve akarlar, karıncalar, haşereler gibi zararlı böcekler için sebzeler ve hayvanlar üzerindeki endo ve ekto parazitlerin kontrolü dahil çeşitli mahsullerde kullanılabilir (Muccio ve ark., 1997). Aynı zamanda sıtma ve diğer vektör kaynaklı hastalıkların kontrolünde de kullanılır (Barlow ve ark., 2001). Hızlı metabolizması ve insanlara ve diğer hedef olmayan hayvanlara karşı düşük toksisitesinin yanı sıra çok sayıda zararlı böcek üzerindeki

yüksek potansiyeli nedeniyle, tükelerin çoğunda bir seçim haline gelmiştir (Chargui ve ark., 2012). Böcek öldürücü ve antiparaziter formülasyonlar olarak piretroit kullanımı, son yıllarda organofosforlu insektisitlerin satışındaki kısıtlamalar nedeniyle belirgin şekilde artmıştır (Kumar ve ark., 2015).

Deltametrin çok lipofilik bir kimyasal olduğu için organik çözücülerde çözünür ve suda çözünürlüğü çok azdır. Lipofilik özelliği nedeniyle hücre zarı aracılığıyla çok çabuk bir şekilde hücre içerisine girebilmektedir. Bu nedenle deltametrinin sodyum kanalları dışındaki zar proteinlerine, hatta hücre içi membran sistemine bile zarar verebileceği tartışılmıştır (Chinn ve Narahashi 1986; Michelangeli ve ark., 1990).

2.2.1.4 Deltametrinin Vücuda Emilimi ve Metabolizması

Deltametrin, içerisinde ester grubunun varlığından dolayı memelilerde düşük toksisite göstermiştir (Aldridge, 1990).

İnsanlarda ve hayvanlarda deltametrine maruz kalmanın en önemli kaynakları kirli yiyecek ve sudur. Bu nedenle oral yoldan kolayca emilir (Barlow ve ark., 2001). Tarımda ve halk sağlığında piretroit insektisitlerin kullanımının artması, uçakların dezenfekte edilmesi ve DEL ile emprenye edilmiş sivrisinek ağlarının kullanılmasıyla ve çeşitli şekillerde kişisel korunmaların kullanılması insana bu insektisit sınıfına maruz kalma şansını arttırmıştır (Janakara ve ark., 1995; Kumar ve ark., 2015)

Laboratuvar sıçanlarında ve farelerinde yapılan çalışmalarda hücreye ağız yoluyla alınan deltametrinin bağırsaklardan hızlı bir şekilde emildiği görülmüştür. Sıçanlarda yapılan çalışmaların sonucu olarak, deltamethri hızlı bir şekilde bağırsak duvarındaki esteraz enzimleri ve karaciğerdeki mikrozomal oksidaz enzimleri tarafından metabolize edildiği gösterilmiştir (He ve ark., 1991).

Deltametrin, kemirgenlerde ilk metabolize olduğunda ester bağı kırılarak asit ve alkoller üretilir. Bazı molekül bölgeleri oksidaysona uğrayabilir. Ester bağı kırıldıktan sonra üretilen alkol ve asit ürünleri ardından sülfürik asit, glisin veya glukuronik asit molekülleri ile konjugasyon reaksiyonlarına girer.

Deltametrin oral yolla vücuda alındıktan 2-4 gün sonra deltametrine ait çoğu metabolitler ve metabolize olmayan deltametrin (toplam alınan deltametrinin (yaklaşık %13-21'i) vücuttan dışkı ile atılır. Deltametrinde metabolite olan bir siyano

grubu ise, önce tiosiyanide çevrilir ve vücuttan daha yavaş bir şekilde uzaklaştırılır. Bu ürünün mide ve deri yoluyla vücuda alınmasının üzerinden yaklaşık sekiz gün geçtikten sonra bile %20'sinin hala vücutta bulunduğu rapor edilmiştir (He ve ark., 1991; Myers, 1998).

İnsanlarda deltametrinin nasıl metabolize olduğu üzerine bilgiler çok kısıtlıdır ancak kemirgenlerdekine benzediği ihtimali düşünülmektedir. Üç erkek gönüllü üzerinde yapılan çalışmada deltametrinin insanlarda nasıl absorbe olduğu ve vücuttan nasıl atıldığı araştırılmıştır (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001). Bu gönüllüler radyoaktif ¹⁴C ile işaretlenmiş deltametrini 3 mg'lık tek bir doz halinde ağız yoluyla almışlardır (IPCS 1990; Bhunya ve Pati, 1990). Plazma deltametrin seviyesi, vücuda alındıktan 1-2 saat sonra en yüksek seviyeye çıkmış ve plazmadaki yarı ömrünün 10-11,5 saat arasında olduğu tespit edilmiştir. Salya ve kan hücrelerinde seviyenin çok düşük olduğu görülmüş ve beş gün boyunca %10 -26'sının dışı, % 50-51'nin idrar yoluyla atıldığı tespit edilmiştir. İdrarla 24 saatte %90'lık kısmı vücuttan atılmıştır. İdrardaki yarılanma ömrü plazmadakine benzer şekilde 10-13,5 saat olarak tespit edilmiştir. Deltametrinin bir metaboliti olan 3-(2, 2-dibromovinil)-2, 2-dimetilsiklopropan karboksilik asit vücutta bulunmuştur. Bu ürün deltametrin kullanan işçilerde de görülmektedir. Bu da ester bağının aynı rodentlerde (kemirgenlerde) olduğu gibi hidrolize olduğunun göstergesidir (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001).

Memelilerle yapılan çalışmalarda deltametrinin ve deltametrin metabolitlerinin karaciğerde biriktiği bildirilmiştir (Cole ve ark., 1982; Anand ve ark., 2006). Ayrıca nörotoksisite (Husain ve ark., 1994), alerji ve bağışıklık sistemini baskılaması (Hoellinger ve ark., 1987; Lukowicz-Ratajczak ve Krechniak, 1992), kan-damar hastalıkları, Forshaw ve Bradbury, (1983) üriner sistemine yan etkileri, Issam ve ark., (2009) karaciğere ve böbreklere toksisitesi de rapor edilmiştir (Chargui ve ark., 2012).

2.2.1.5 Deltametrinin Toksik Etkileri

Deltametrinin sinekler, diğer artropotlar ve balıklar için son derece zehirli olmasına rağmen, memelilerde metabolizması ve atılımı hızlı olduğu için daha düşük derecede zehirli olduğu belirtilmiştir (Kaya, 2005). Vücutta titreme, kıvranma, el, yüz ve

ekstremitelerde kaslarında yavaş ve ani kasılmalar, tükürük salgılama (CS sendromu olarak da bilinir), vücudun tümünün veya bir kısmının sarsılması, deride tahriş, kilo kaybı, kas ve bezlerde uyumsuzluk solunum güçlüğü, gözlerde ve kaslarda sürekli veya aralıklarla ortaya çıkan istem dışı kasılmalar, titremeler, hiperaktivite ve aşırı hassasiyet kemiricilerde toksik etkinin sebep olduğu bazı belirtilerdir (Barlow ve ark., 2001). Deride kızarıklık, uyuşma, kaşınma, karıncalanma ve vücudun bazı yerlerinde duyu bozukluğu gibi deri semptomları, hapşırma, burun akıntısı yüzde yanma hissi ve daha ağır vakalarda kaslarda fazla ve istemsiz kasılmalar, baş dönmesi, halsizlik, mide bulantısı ve şiddetli baş ağrısı, iştahsızlık mesleki maruz kalmalarda kayıtlı olan zehirlenme belirtileridir. Bunun dışında nadir olarak akut insan zehirlenmesi de görülebilir. 13 yaşında bir kız çocuğunun 5 gr deltametrini oral yolla alarak intihar girişimi vakası kas krampları, bilinç kaybı taşikardi ve göz bebeğinin daralmasıyla sonuçlanmıştır (Barlow ve ark., 2001).

2.2.2 Neonikotinoit Grubu İnsektisitler

2.2.2.1 Neonikotinoitlerin Genel Özellikleri

Neonikotinoitler 1980'lerde geliştirilmiştir ve ticari olarak temin edilebilen ilk bileşik olan imidacloprid, 1990'ların başından beri kullanılmaktadır (Kollmeyer ve ark. 1999). Neonikotinoit insektisitler yapılarında nikotin bulduran ve 6-kloro- 3-piridinil grubu ve bunların azometin metabolitleri ve analoglarından oluşurlar (Tomizawa ve ark., 2001). Neonikotinoit insektisitler, çok sayıda haşere böceklerine karşı seçici aktiviteleri ve çok çeşitli tarımsal uygulamalar için çok yönlülükleri nedeniyle pazara sunulan en hızlı büyüyen pestisit sınıfıdır.

N-nitroguanidinler (imidacloprid, tiamethoxam, clothianidin ve dinotefuran), nitrometilenler (nitenpyram) ve N-siyanoamidinler olmak üzere üç kimyasal gruptan birine sınıflandırılabilirler (Jeschke ve ark., 2011).

Neonikotinoitler suda çözünür ve bitkiler tarafından kökleri veya yaprakları yoluyla kolayca emilirler ve daha sonra bitkinin dokuları boyunca taşınırlar. Bu, haşerenin kontrolünde, bitkinin tüm kısımlarını korudukları için birçok avantaj sağlar; örneğin, her ikisi de sistemik olmayan bileşiklerin yaprak spreyleri kullanılarak kolayca kontrol edilemeyen sıkıcı böceklere ve kök besleme böceklerine karşı etkilidirler. Omurgalılara düşük toksisite, böceklere yüksek toksisite göstermesi dünya genelinde en yaygın kullanılan pestisitler arasında hızlı bir şekilde neonikotinoitlerin ortaya

çıkmasına neden olmuştur. Bu pestisitler diğer pestisit sınıflarından daha fazla kullanılmaktadır ve kullanılan bütün pestisitlerin yaklaşık dörtte birini içermektedir (Jeschke ve ark., 2011).

2.2.2.2 Neonikotinoitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri

Neonikotinoitler, nikotinden türetilmiş yeni bileşikler anlatan bir terimdir ve bu grupta imidakloprid, asetamiprid, klotianidin ve tiokloprid bulunmaktadır. Nikotinik asetilkolin reseptörlerinin agonisti olarak etki gösterir ve bu reseptörlerin böcekte ve memelide farklı tipleri olmasından dolayı memeli toksisitesi düşük kabul edilen maddelerdir. Bununla birlikte, yakın zamanda, neonikotinoit içeren böcek öldürücülerin, omurgalıların nikotinik reseptörlerini aktive edebilmeleri ve / veya modüle edebilmeleri nedeniyle insanlar üzerinde daha güçlü yan etkilerin olabileceği de bildirilmiştir (Li ve ark., 2011).

Kemirici ve kemirici olmayan canlı grupları ile yapılan çalışmalarda, farklı THIA dozlarının uygulanması oral, deri ve solunum yoluyla THIA'e maruz kalma sonucunda karaciğerdeki detoksifikasyon enzimlerinin ve oral yolla alınmasından sonra steroid hormon sentezini sağlayan bazı enzimlerin aktivitelerinin yükselmesinden sonucu, başlıca hepatoksisite ve tiroit toksisitesi belirlenmiştir (Şekeroğlu, 2010). Nikotinik asetilkolin reseptörü agonistleridir; merkezi sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR'ler) kuvvetlice bağlanır, düşük konsantrasyonlarda sinir stimülasyonuna neden olur, ancak reseptör tıkanması, felç ve daha yüksek konsantrasyonlarda ölüme neden olabilir. Neonikotinoitler böcek nAChR'lerine omurgalı hayvanlardan daha güçlü bağlanırlar, bu yüzden seçici olarak böceklere karşı daha toksiktirler (Tomizawa ve Casida, 2005).

2.2.2.3 Thiakloprid

Thiakloprid [3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide], neonikotinoit bileşikler sınıfına ait bir pestisittir (Mullins, 1993). Işığa dayanıklılığının iyi olması ve omurgalılara göre böcekler üzerine yüksek seçici toksisite göstermesi, bu insektisit dünya çapında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Nauen, 1995). İlk kloronikotinil neonikotinoit insektisittir ve 2000 yılında Calypso ticari ismi olarak tescil edilmiştir (Elbert ve ark., 2001; Erdelen, 2001). Çok yaygın olarak kullanılan bu insektisit, geniş spektrumludur. Bitkilerin vasküler (floem ve ksilem) dokusu tarafından emilir ve bitkinin her bölgesine yayılır.

Bu nedenle bitkiyi delerek özünü emen haşerelere çok çabuk olarak etki gösterir (Maienfisch ve ark., 2001). Geniş spektrumlu böcek öldürücü aktivitesi, düşük uygulama oranları gibi benzersiz biyolojik ve kimyasal özelliklere sahiptirler (Maienfisch ve ark., 2001). Nikotik asetilkolin reseptör inhibitörü olarak hareket ederek böceğin sinir sistemini bozarak hareket eder (Osterauer ve Kohler, 2008). Günümüzde bu böcek öldürücüler, birçok üründe çeşitli zararlı türleri kontrol etmek için çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Elbert ve ark., 2000). Dünya genelinde bu insektisit kullanımını giderek yaygınlaştığından, canlı organizmalar üzerindeki olası genotoksik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi çok önemlidir.

2.2.2.4 Thiaklopridin Vücuda Emilimi ve Metabolizması

Thiakloprid, chloropyridylmethyl grubu bir neonikotinoittir. Solunma, dermal ve oral yollar thiakloprid'in vücuda başlıca giriş yollarıdır. Ratlara oral yolla verilen thiakloprid dozunun % 60-80'inin hızla emildiği belirlenmiştir. Doz uygulamasından yaklaşık 3-4 saat sonra plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştığı ve bazı metabolik süreçler geçirdikten sonra dışarı hızı bir şekilde atıldığı tespit edilmiştir. Kinetik otoradyografik ve çalışmalar thiaklopridin; tiroit, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak, gastrointestinal sistem ve deri gibi uzuvlar başta olmak üzere vücudun tamamına yayıldığını göstermiştir. Thiaklopridin dokulardaki iz ölçümü genellikle düşüktür. Fakat dağılım şekli ve iz ölçüm, cinsiyete ve doza bağlı olmakla birlikte, genellikle benzerdir. Yüksek dozlarda her iki cinsiyette de vücuttaki kalıntı miktarlarının arttığı, fakat dişilerin vücutlarındaki kalıntı miktarının erkeklere göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek dozlara maruz kalma sonucu, en yüksek kalıntıların uygulamadan yaklaşık 48 saat sonra bulunduğu gösterilmiştir (APVMA, 2001; EPA, 2003; ECB, 2008).

Thiakloprid tanımlanmış 25 metaboliti ile kapsamlı bir şekilde metabolize edilir ve sırasıyla metabolizma basamakları; thiazolidine halkasının hidroksilasyonu ve glukoronidasyonu, cyanamide kısmının hidroksilasyonu, thiazolidine halkasının açılması, oksazol halkasının oluşumu, thiazolidine halkasının oksidasyonu, metilasyonu ve metilen köprüsünde oksidatif yarığının oluşmasıdır (Şekeroğlu, 2010).

Thiaklopridin bazı metabolik süreçler ile beraber alınan dozun %90'ı yaklaşık 48 saatte vücuttan hızlı bir şekilde uzaklaştırılabilir. Boşaltım sistemi, solunum sistemi ve sindirim sistemi vücuttan uzaklaştırılmasında başlıca rolü üstlenir. Vücuda giren dozun yaklaşık %60- 80'i üre ile, %39'u dışkı ile, %1 veya daha az kısmı ise ekspirasyon havası ile atılır (Şekeroğlu, 2010).

2.2.2.5 Thiaklopridin Toksik Etkileri

Oral, deri ve solunum yoluyla thiaklopride maruz kalma sonucunda karaciğerdeki detoksifikasyon enzimlerinin ve oral yolla alınmasından sonra karaciğerde steroid hormon sentezini sağlayan bazı enzimlerin aktivitelerinin yükselmesinden dolayı, tekrarlayan dozlarda vücuda alınması sonucu hedef organın karaciğer olduğu düşünülmektedir. Diğer hedef organlar olan tiroit bezi ve adrenal bezler üzerindeki etkilerinin, karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin artışıyla ilgili olarak ortaya çıktığı kabul edilmektedir (Şekeroğlu, 2010)

Sekeroğlu ve ark., (2011) 30 gün boyunca sıçan kemiği iliği hücresi *in vivo* çalışmalarında thiakloprid'in mitotik indeks (MI) ve binükleer hücre sayılarını önemli ölçüde azalttığını ve kromozom sapmalarını (CAs; 24 saat boyunca 112.5 mg/kg,) önemli ölçüde arttırdığını ve ayrıca mikronükleer binükleer hücrelerde (22.5 mg/kg / gün) önemli bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. Diğer nikotin grubu insektisitler gibi bitkinin merkezi sinir sistemini nikotinik asetil kolin esteraz reseptörlerine bağlanarak etkilemektedir. Hücre ve dokularda reseptörlere bağlanarak asetil kolin birikmesiyle beraber felce sebep olmaktadır. (Zhang ve ark., 2000 ve Iwasa ve ark., 2004). Nikotin grubu içerisinde olmalarına rağmen insanlara nikotin ve türevlerinin gösterdiği toksik etkiyi göstermemekte, bu nedenle yaygın olarak kullanılmaktadır (Tomizawa ve Casida, 2003).

Yaygın kullanılmasına sebep olan bütün bu avantajlara rağmen balıklarda akut toksisiteye neden oldukları rapor edilmiştir (Tomizawa ve Casida, 2005). Yapılan bazı araştırmalar thiaklopridin arılar tarafından hızlı bir şekilde metalaşır edildiğini, bu nedenle arılara karşı toksik etkisi olmadığını ileri sürmektedir. Ancak subletal dozdaki thiaklopridin bile, arılarda yüksek mortaliteye sebep olduğunu gösterilmiştir (Vidau ve ark., 2011). Sıçanlarda yapılan kısa ve uzun süreli ağız yoluyla thiakloprid alımı sıçan karaciğeri ve tiroit bezinde etkilere sebep olmaktadır. Thiakloprid yalnız

verildiğinde ve deltametrim / thiakloprid karışımı sıçanlara lenf organlarında ve plazmada antioksidan enzim seviyesinde azalmaya sebep olduğunu rapor edilmiştir (Aydın, 2011).

2.3 Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri ve yüksek derecede tahrip edici yapıları uzun yıllardır bilinmektedir, ancak hayati organlar üzerindeki çeşitli patofizyolojik etkileri hala büyük ilgi çekmektedir. Oksidatif stres, en basit şekilde, hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin üretimi ile vücudun antioksidan savunması arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Birçok ksenobiyotığın toksisitesi, sadece kendileri için toksik olmayan aynı zamanda birçok hastalığın patofizyolojisine de dahil olan serbest radikallerin üretimi ile ilişkilidir. Örneğin, Alzheimer hastalığında önemli bir nörodejenerasyon mekanizması olarak oksidatif strese dair geniş kanıtlar vardır (Abdollahi ve ark., 2003).

Kadmiyum ve kurşun gibi birçok çevresel kimyasallara uzun süre maruz kalmak, biyolojik sistemdeki olumsuz etkilerin altında yatan bir mekanizma olarak oksidatif strese neden olabilir. Pestisitler, biyolojik sistemleri olumsuz yönde etkileme potansiyelleri nedeniyle bilerek çevreye salınan kimyasal sınıflardan birini temsil eder, bu nedenle toksik potansiyelleri için yoğun olarak çalışılmıştır. Pestisit kaynaklı oksidatif stres aynı zamanda son yıldır olası bir toksisite mekanizması olarak toksikolojik araştırmaların odak noktası olmuştur. İnsanlarda veya hayvanlarda oksidatif stresin bu gruptaki çeşitli ajanlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığı ve toksik etkileriyle ilişkili olup olmadığını belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Abdollahi ve ark., 2003).

Oksidatif stres, çeşitli toksinlerin ve hastalıkların patofizyolojisinde rol oynar. Oksidatif stres, sağlam hücrelerde prooksidant/antioksidan sistemlerinin denge durumlarında bir rahatsızlık olarak tanımlanmıştır. Oksijenin potansiyel olarak zararlı etkilerinin çoğu, diğer maddelere oksijen verme eğilimi yüksek olan reaktif oksijen türleri olarak bilinen bir dizi kimyasal bileşiğin oluşması ve aktifleşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu tür reaktif türlerin çoğu serbest radikaldir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektronlu moleküllerdir ve bu nedenle kararsız ve yüksek oranda reaktiftir. Serbest radikaller, hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve

lipit peroksil radikalleri gibi çeşitli kimyasal yapılara sahiptir. Reaktif oksijen türleri kararsız ve yüksek oranda reaktif partiküllerdir, çünkü bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektrona sahiptirler ve bu nedenle stabilite ararlar, radikaller moleküler yapıya ve fonksiyona zarar veren başka bir elektron elde etmek için yakındaki moleküllere saldırırlar. Reaktif oksijen türleri, hücrelerde normal metabolik ve sinyal iletim olaylarının ürünleridir, ancak patolojik bir süreçte de önemli bir rol oynayabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve diğer radikaller, mutasyon, karsinogenez, dejeneratif ve diğer hastalıklar gibi çeşitli biyolojik olaylarda, birleşmede, yaşlanmada ve gelişimde rol oynarlar. ROS, zararlı ve yararlı türler olarak ikili bir rol oynadığı için iyi tanınmaktadır. Serbest radikaller ve diğer ROS, insan vücudundaki normal metabolizmada; ozon, sigara, pestisitlere ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dış kaynaklardan elde edilir (Soltaninejad ve Abdollahi, 2009).

Her ne kadar çok sayıda çalışma pestisitlere maruz kalma ve oksidatif stres oluşumu arasındaki ilişkiyi ele alsada bunlar oldukça farklı türdendir. Bu çalışmalarda kan dahil farklı dokularda ve maruz kalma dozlarında ve koşullarında (akut veya kronik) incelemeler yapılmıştır. Deney hayvanları hakkındaki mevcut veriler, Thapar ve ark., (2002); John ve ark., (2001) ve *in vitro* çalışmalar, antioksidan savunma ile ilgili enzimlerin olduğunu göstermektedir ve bu mekanizmalar pestisitlerin etkisi altında değişmektedir (Dowla ve ark., 1996; Singh ve ark., 2006). Bununla birlikte, bu çalışmalar, antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttığını veya azaldığını bildirildiği için tartışmalı sonuçlara yol açmıştır. Aktiviteler arttığında, pestisitler tarafından üretilen oksidatif stresi gidermek için serbest radikal temizleyici enzimlerin indüklenmesine yol açan telafi edici mekanizmanın bir aktivasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Buna karşılık, antioksidan enzimlerdeki azalma, pestisit metabolizması sırasında üretilen oksidatif moleküllerin bağlanmasından kaynaklanan enzimlerin dolaylı bir inhibisyonu olarak yorumlanmıştır. (Panemangalore ve ark., 1999; Lee ve ark., 2006).

2.4. Lipit Peroksidasyonu

Mitokondriyal ROS üretiminin lipitler gibi makromoleküllerde, lipit peroksidasyon üreten kovalent modifikasyonlara neden olduğu bilinmektedir. Lipit peroksidasyon, kontrollü bir şekilde ilerlediğinde ve bazı hücresel bölmelerle sınırlı olduğunda,

hücrelerin farklılaşması, olgunlaşması, hücre içi veziküllerin trafiği, fagositoz, antijen üretimi vs. gibi yararları olabilir. Bu işlem, zarın yeniden biçimlenmesini sağlar ve geçici ve yerel kararsızlaştırma gerektirir. Membran tabakası içindeki kovalent olmayan etkileşimleri değiştiren lipit peroksidasyonu, lokal membran istikrarsızlığına katkıda bulunabilir. Lipit peroksidasyonundan olumlu bir hücre sonucu ancak işlemin sıkı bir düzenlemesi varsa ortaya çıkabilir. Bu düzenleme, mitokondriyal solunum tarafından ROS oluşumuna karşı çıkan bazı enzimatik ve enzimatik olmayan sistemlerin hareketleri arasındaki uygun denge tarafından sunulmaktadır (Cejas ve ark., 2004).

Bu bağlamda, ROS üretimindeki bir fazlalık dengeyi kaldırabilir ve lipit peroksidasyonunda bir fazlalığa neden olabilir. Lipit peroksitler, bifonksiyonel aldehitler olan toksik ürünlerin parçalanmasında ayrışması nedeniyle hücre hasarına neden olur. Bu aldehitler göreceli olarak kararlıdır. Hücre içinde dağılır, hatta hücre içinde olması gereken bölgesinden daha uzak hedeflere saldırabilir. Proteinler, DNA ve fosfolipitler gibi biyomoleküller ile fasile reaktivite gösterirler ve çeşitli intra ve inter moleküler toksik kovalent eklentiler oluştururlar (Blair, 2001; Cejas ve ark., 2004). Bu aldehitlerin ayrıca fizyolojik ve / veya patolojik koşullarda biyoaktif moleküller olarak da işlev görebilecekleri tarif edilmiştir. Sinyal iletimi, gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve diğer hücre yanıtları dahil olmak üzere çok düşük ve toksik olmayan konsantrasyonlarda birkaç hücre fonksiyonunu etkileyebilir ve modüle edebilirler. Bu olaylar, ROS aracılı hücre sinyallerinin sinyal dönüştürücüleri olduklarını göstermektedir (Cejas ve ark., 2004).

Lipit hidroperoksitler, *in vivo* olarak çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki ROS etkisinden serbest radikal yolaklar yoluyla oluşturulur. Bunlar ayrıca spesifik lipoksijenaz ve siklooksijenaz ürünleri olarak da oluşur (Blair, 2001). Hücre membranları temel olarak lipit peroksidasyonunun hedefidir. Oluşum mekanizması doğrudan ROS saldırısı veya linoleik asit ve arakidonik asit üzerindeki enzimatik saldırıdır. Her iki asit de membranlarda en sık doymamış yağ asitleridir. Linoleik asit, ROS veya enzimatik saldırı ile dioksijenleştirilir; bu, iki yağ asidi hidroperoksit enantiyomerinden, yani 13-hidroperoksikotadenoik asitten (13-HPODE) ve 9-HPODE'den oluşan eşit bir karışım ile sonuçlanır (Ward, 1998; Brash, 1999; Hamberg, 1998; Cejas ve ark., 2004). Bu hidroperoksitler, doymamış yağ asidi

oksidasyonu için başlangıç ürünleridir; ancak, nispeten kısa bir ömre sahiptirler. Oluştuklarında ya GPx tarafından reaktif olmayan yağ asidi alkollerine dönüştürülürler ya da bazı reaktif ürünlere (epoksitler, aldehitler), 4-HNE'ye yol açan, Fe (2+) ve Cu (1+) metalleriyle reaksiyona girerler (Lee ve Blair, 2009).

2.5. Antioksidan

İnsan vücudunun serbest radikallerin yol açtığı hasarı önlemek için çeşitli mekanizmaları vardır. İnsan vücudunun temel ve en belirgin savunma mekanizması antioksidan ajanlardır. Antioksidan terimi, bir hedef moleküle oksidatif hasarı geciktiren veya engelleyen herhangi bir madde olarak tanımlanmıştır. Bu moleküller serbest radikalleri elektron bağışlayarak nötralize edecek kadar stabildir. Bugün birçok bileşiğin antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur, ancak insan vücudunda iki ana sistemde sınıflandırılabilirler. Serbest radikallerin zarar görmesine karşı temel savunma sistemi oksidasyona karşı olan enzimatik sistemdir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Vücut, E vitamini, C vitamini ve A vitamini öncüsü olan beta karoten gibi antioksidan vitaminlerin havuzlarını tutar. Bu ilk savunma sistemi tüm serbest radikalleri kullanmaya çalışır, ancak oksidatif stres sistemin kapasitesinden çok büyükse, ikinci savunma hattı (vitaminler) devreye girebilir. Vitaminler serbest radikalleri temizler ve giderir, ancak işlemden oksitlenir ve inaktive edilir. Bu antioksidan besinlerin her birinin kendine özgü aktiviteleri vardır ve genellikle vücudun genel antioksidan kapasitesini artırmak için sinerjik olarak çalışırlar (Abdollahi ve ark., 2004).

Bu tezin konusu insektisitlerin piyasaya sürülmüş hazır formülasyonundaki karışımı şeklinde insan hücrelerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir *in vitro* çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu proje, bu insektisit karışımına maruz bırakılan insan akciğer hücrelerindeki sitotoksikite ve oksidatif stres potansiyelini belirleyerek literatürdeki bu açığın kapatılması amaçlanmıştır. Bu sayede çalışma sonuçlarına göre DNA hasarı ve karsinogenez için risk değerlendirmesi yapılması ve sonraki çalışmalara ışık tutması planlanmıştır. Pestisitlerin karışım halinde kullanıldığında sinerjistik etkileşim meydana getirerek toplam toksik etkide artışa yol açtığı düşünülürse, Şekeroğlu, (2010); Şekeroğlu ve ark., (2013), bu iki insektisit karışımının insanda ortaya çıkarabileceği toksik etkinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Günümüzde kullanılan sentetik pestisitlerin yararlı etkilerinin yanı

sıra zararlı etkileri de bilinmektedir. Son derece toksik olduğu bilinen sentetik pestisitlerin zorunlu kullanımları durumunda hedef organizmaların ve konsantrasyonlarının çok iyi belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda kullanılması planlanan karışım halindeki DEL ve THIA insektisit kombinasyonunun insan akciğer fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkilerinin ve reaktif oksijen türlerini oluşturma potansiyelinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bahsedilen literatür eksikliği göz önüne alındığında bu çalışma ile bu karışımın insan akciğer fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkisi, canlı ve proliferen hücrelerin tespitini sağlayan MTT testi ile belirlenecektir. Oksidatif stres üzerindeki etkileri ise hücrelerin glutatyon (GSH) seviyeleri ve hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artıran lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerinin ölçülmesiyle belirlenmiş olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

3.1.1 Karbondioksit (CO₂)'li İnkübatör

Hücrelerin çoğaltılması ve kültürün devam ettirilmesi için CO₂'li inkübatör kullanılmıştır. CO₂'li inkübatör hücreleri 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem altında tutmaktadır. Çalışmalarımızda Memmert Une 400 model CO₂ inkübatörü kullanılmıştır. İnkübatörün nemi, içerisinde steril su bulunan bir kabin sayesinde sürekli sabit kalması sağlanmıştır.

3.1.2 Hücre Sayım Cihazı

Çalışmalarımızda kullanılan hücreler masa üstü İnvitrogen Cell Counter marka MP10227 model hücre kültür sayımı cihazı ile sayılmıştır. Standard Tripan Mavisi boyama yöntemini kullanarak canlı, ölü ve toplam hücre sayılarını ve hücre canlılığı oranlarını otomatik olarak belirlemekte ve sayımlarda tutarlılık temin etmektedir.

3.1.3 Biyogüvenlik Kabini

Hücre kültürlerinin ekimi ve test solüsyonlarının hazırlanması kontaminasyonu engellemek amacıyla biyogüvenlik kabini içerisinde steril bir ortamda yapılmıştır. Laboratuvarımızda ESCO Class II biyogüvenlik kabini kullanılmaktadır. Biyogüvenlik kabini deneylere başlamadan önce ilk olarak 30 dakika süreyle UV ışınla daha sonra %70'lik etanol ile sterilize edilmiştir. Deneyler bittikten sonra kabin %70'lik etanol ile silinmiş ve daha sonra 30 dakika süreyle UV ışınla sterilize edilmiştir.

3.1.4 Santrifüj

Hücre süspansiyonlarındaki hücreleri çöktürmek için MPW marka MPW-351R santrifüj kullanılmıştır.

3.1.5 Su Banyosu

Solüsyonlar uygulama öncesi Daihan WB22 model su banyosu içerisinde bekletilerek optimum sıcaklığa getirilmiştir. Kontaminasyonu önlemek için su banyosunun suyu düzenli olarak haftada bir değiştirilmiştir.

3.1.6 Hassas Terazi

Kimyasal malzemeler Radwag AS 220 R2 model hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Hava akımından dolayı ortaya çıkacak tartım hatalarını engellemek için cam paravanlı koruyucuları olan terazi kullanılmıştır.

3.1.7 Vorteks Karıştırıcı

İnsektisit solüsyonları uygulama öncesinde Stuart SA8 Vorteks karıştırıcı kullanılarak, dairesel salınımlı hareketlerle homojenize edilmiştir.

3.1.8 İnvirt Mikroskop

Leica DM IL LED mikroskop çok kuyucuklu plakaların incelenmesinde kullanılmıştır. İnvirt mikroskop göz merceği 10 kere, objektif mercekleri ise 10 kere, 20 kere ve 40 kere büyütme özelliğine sahiptirler. Bu mikroskopla yapılan hücre özelliklerinin ve kültürün izlenmesinde hücreler 100–400 kat oranında büyütülerek izlenmiştir.

3.1.7 Mikroplaka Eliza Okuyucu

Kullanılan kimyasalların sitotoksik etkileri, gsh miktarına etkisi ve lipit peroksidasyonunu belirlemek için 96-kuyucuklu plakalarda üretilen hücrelerin proliferasyonu BioTek Elx800 model mikroplaka ELIZA okuyucusu da absorbans değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.1 İnsektisitler

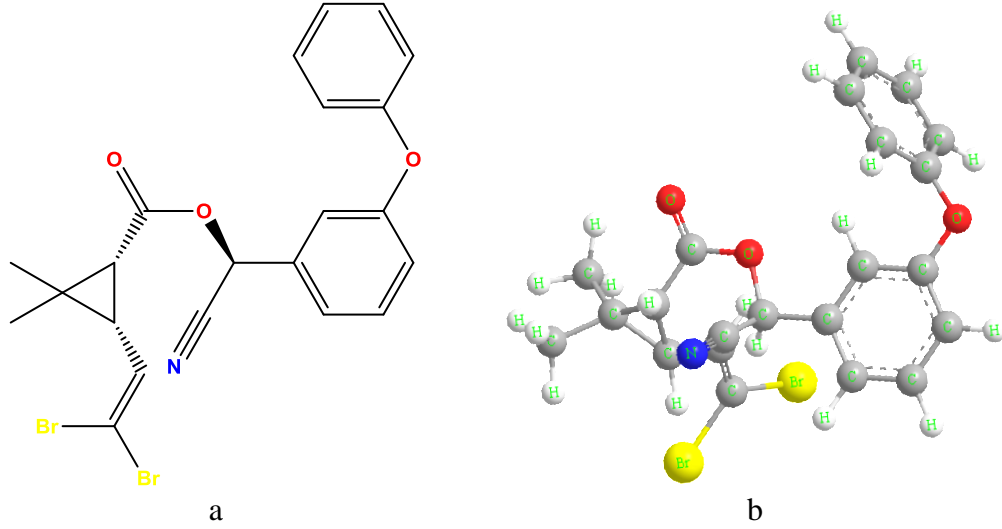
Çalışmalarımızda insektisitlerin etken maddeleri kullanılmıştır.

3.2.1.1 Deltametrin (SIGMA)

Kimyasal Adı: [S]-alphacyano-3-phenoxybenzyl-[IR]-cis-3-[2,2-dibromovinyl]-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

Ticari Adı: Atacis, Agmetrin, B-Katrina, Caracole, Cislin, Crackdown, Decan, Deltabiol, Decis, Delpaz, Dedare, Delphine, Deltharin, Dekagard, Delete, Delta,, Deltagurcis, Deşarj, Deltis, Demond, Depar, Derris, Deltasis, Global Fixmethrin, Grandthrin, Impamethrin, Keshet, Kulderin, Lenadectina, Nikriz, Serdesiz, Topraxdel, Patriot, Parole, Zodiac.

Ampirik Formulu: C₂₂H₁₉Br₂NO₃
Molekül Ağırlığı: 505.206 g/mol
Erime noktası: 98 °C (208 °F; 371 K)
Buhar basıncı: 9.3x10⁻¹¹ mm Hg (25 °C)
Çözünürlük: Suda çözünmez (20 °C)



Şekil 3.1 Deltametrin (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü

3.2.1.2 Thiakloprid (SIGMA)

Kimyasal Adı: [3-[(6-chloro-3-pyridinyl) methyl]-2-thiazolidinylidene] cyanamide

Ticari Adı: Bariard, Biscaya, Calypso.

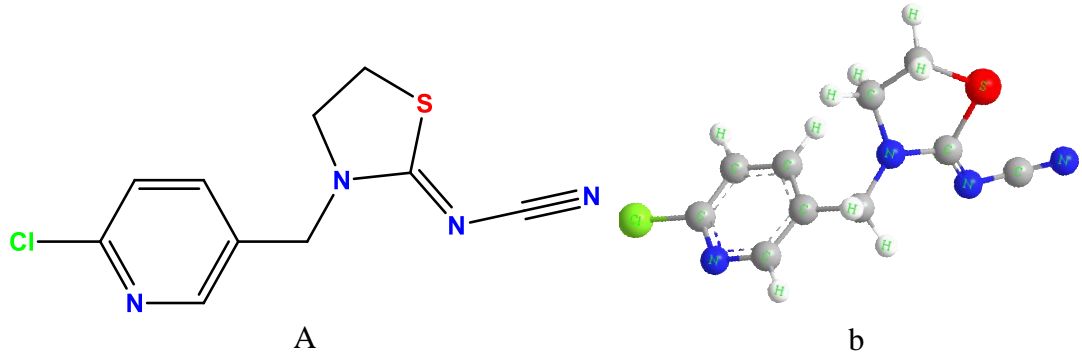
Ampirik Formulu: C₁₀H₉ClN₄S

Molekül Ağırlığı: 252.72296 g/mol

Erime noktası: 136 °C (277 °F; 409 K)

Buhar basıncı: 6.0 x 10⁻¹² mm Hg (20 °C)

Çözünürlük: Suda 185 mg/L at (2 °C)



Şekil 3.2 Thiaklopidin (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top–Cubuk Formülü

3.2.2 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK)

Polar bir çözücü olan DMSO, deltametrin ve thiaklopidinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda kontrol grupları da dozların uygulandığı gruplarda kullanılan konsantrasyondaki DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler uzun süreli saklanacağı zaman, sıvı azot içerisinde dondurularak saklanmaktadır. Sıvı azot, hücreler içerisindeki sıvıların donmasına sebep olduğu için donma noktasını düşürecek soğuktan koruyucu (kryoprotektif) ajanlar eklenmesi gerekmektedir. Çalışmalarımızda DMSO aynı zamanda kryoprotektif ajan olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Attachment Faktör (AF) (GIBCO)

Bağlantı faktörü ya da attachment faktör kollajen proteini içeren ve hücrelerin kültür kabı içerisinde ince bir tabaka olarak büyümesini sağlayan bir dış matris maddesidir. Aynı zamanda hücre çoğalmasına ve hücrelerin kendilerine özgü olan morfoloji ve fonksiyonlarını korumasına yardımcı olur. Deney öncesi kullanılacak olan kaplar AF ile yıkanmıştır.

3.2.4 Ultra Saline (LONZA)

Pasajlamaları yapılmadan önce ve besiyeri uzaklaştırıldıktan hemen sonra hücreler yıkama solüsyonu olan ultra salin ile yıkanmıştır. Ultra salin, kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon tuzlu suyudur. Hücre yüzeyinden besiyeri içerisinde bulunan bütün kimyasalların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

3.2.5 Tripsin-EDTA (LONZA)

Hücre pasajlanması ve insektisit uygulaması sırasında hasatı yapılacak hücrelerin kültür kabından ayrılmalarını sağlamak için, hücreler Tripsin–EDTA ile muamele edilmiştir. Bir serin proteaz enzimi olan tripsin, hücrelerin kültür kabıyla yaptıkları protein bağlarını lizin ve arjinin aminoasitlerinin olduğu bölgelerden yıkar. Tripsin içerisinde bulunan etilendiamintetraasetik asid [(C₁₀H₁₆N₂O₈) EDTA], hücre kabı içerisinde bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonlarını ortamdan uzaklaştırarak ortamı nötral hale getirir ve tripsinin daha etkili bir şekilde peptid bağlarını yıkmasını sağlar.

3.2.6 Tripsin Nötrale Solüsyonu (TNS) (LONZA)

Pasajlama bittikten sonra besiyeri içerisinde tripsinin istenmeyen aktivitesini engellemek için TNS kullanılmaktadır. Bu inhibitör %0.05 serpin (Tripsin inhibitörü) ve %0.1 sığır serum albümünü içerir.

3.2.7 Sıvı Azot (LN)

Uzun süreli saklanacak hücreler, sıvı azot içinde dondurularak saklanır. Hücreler sıvı azotun buhar fazında donmaya dayanıklı (kriyojenik) tüpler içerisinde kosmic kalf serum ve DMSO karışımında tutulmuştur.

3.2.8 Trypan Mavisi (GIBCO)

Hücre kültürü pasajlarında ve uygulama gruplarının hazırlanmasında hücre sayılarının belirlenmesi ve hücre canlılığının ölçülmesi amacıyla hücreler trypan blue [C34H28N6O14S4] ile boyanmıştır.

3.2.9 Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO)

Hücreler testlerde kullanılmadan önce pH'ı ve hücre ozmalaritesini sabit tutmak için, Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarını içeren steril PBS tamponuyla yıkanmıştır.

3.2.10. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F-12) (ATCC)

Deneylelerimizde hTERT WHTBF-6 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreleri büyütmek, çoğaltmak ve dondurmak için DMEM: F-12 (ATCC) besiyeri kullanılmıştır. DMEM: F-12 besiyeri; 2.5 mM L-glutamin, 15 mM HEPES, 0.5 mM sodyum piruvat ve 1200 mg / L sodyum bikarbonat içermektedir. Bu besiyeri içerisine hücrelerin çoğalmasına etki eden zengin bir protein çözeltisi olan fetal bovine serumdan 50 µMg/ml eklenmiştir. Fetal bovine serum içerisinde enzimler, hücrenin büyümesi ve

çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunan bir çözeltilidir.

3.3 Yöntemler

3.3.1 Hücre Kültürü

İnsan hücre kültürleri kullanılarak pek çok ajanın genotoksik etkileri etkili bir şekilde araştırılabilir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser araştırmalarında insan kanser hücre kültürleri üzerinde yeni kimyasal maddelerin anti-kanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve daha özgün olduğu ifade edilmektedir (Saygı, 2003). Çeşitli pestisitlere solunum yoluyla maruz kalmanın akciğer kanserine yol açabileceği belirtilmektedir (Gold vd. 1997). Bu nedenle çalışmamızda hTERT WHTBF-6 insan akciğer fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı uygun besiyerinde, %5 CO₂'li inkübatörde, 37 °C'de ve %95 nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin besiyerleri haftada iki defa değiştirilerek gelişimleri izlenmiştir.

3.3.2 Hücre Hattının Çözülmesi

-196⁰C sıvı azot tankında bulunan hücreler oda ısısında bekletilerek hücrelerin çözülmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına ulaşan hücreler bir miktar besiyeri yardımıyla pipetlenerek içerisinde besiyeri bulunan flask içine alınarak ve inkübe edilmiştir.

3.3.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent olduğunda hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin solüsyonu kullanılmıştır. Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalıştığı için 4-5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Tripsin hücre kültür ortamında uzun süre kaldığında hücrelere zarar vereceği için, süre sonunda hücrelerin üzerine eklenen tripsin etkisini azaltmak için tripsin ile eşit miktarda reaksiyon durdurucu solüsyon eklenerek seyreltme işlemi yapılmıştır. Hücre süspansiyonu falkon tüpüne alınarak santrifüj edilerek ve hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Üst kısımda bulunan süpernatant atılıp hücrelerin sayımı yapılacak ve yeni flasklara tekrar hücre ekimi yapılmıştır. Deney için gerekli hücre sağlanıncaya kadar bu işlem devam edilecektir. İleride kullanılmak üzere kalan hücreler ise dondurularak saklanmıştır.

3.3.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin pasajlanması amacıyla elde edilen ve hücre sayımı yapılan hücre süspansiyonu, hazırlanan DMSO dondurma ortamı ile karıştırılmış ve Cryo-vial dondurma tüpleri içerisine her tüpte 1 ml dondurma ortamı olan DMSO içinde 1 milyon hücre olacak şekilde dondurulmuştur. Hazırlanan tüpler ilk önce -80°C'ye alınarak 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonrasında tüm tüpler -196 °C sıvı azot tankına transfer edilmiştir.

3.3.5 Hücre Sayımı

Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometreyle sayılmıştır. Hemositometre, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 9 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp %0,4'lük tripan mavisiyle 100 µl'ye tamamlanmıştır. Yani 10 kat seyreltilmiştir. Hemositometre üzerine bir lamel koyulacak ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan verilerek yayılmıştır. Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için şu formülden yararlanılarak sayılmıştır:

Hücre sayısı/ml = Sayılan hücre miktarı × Dilüsyon oranı (10) × 10⁴/9.

3.3.6 Deney Dozları ve IC₅₀ Belirlenmesi

Çalışmamızda etken madde olarak Proteus adı altında ticari olarak satışı yapılan DEL ve THIA insektisitleri'nin karışımı kullanılmıştır. İlgili ticari formülasyonda katkı ve koruyucu maddeler de bulunduğu için, sadece bu iki insektisit etkisini görebilmek için deneylerimizde bu ticari formülasyonu kullanmak yerine saf olarak temin edilip kullanılmıştır. Bu sayede ticari formülasyonda bulunan diğer maddelerin ortaya çıkarabileceği etkiler önlenmiş olacak ve sadece ilgili insektisitlerin etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kullanacağımız insektisitler ile hazırlanacak karışımda, THIA dozu DEL'in yaklaşık 7,5 katı olacak şekilde ayarlanmıştır.

Planlanan araştırmada insan akciğer hücre kültürüne uygulanacak insektisit karışım dozlarının belirlenmesi için bir ön çalışma yapılmıştır. DEL ve THIA karışımının test konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için on doz üzerinden MTT testi yapılmıştır.

Etken maddelerin karışımı test edilen konsantrasyonlarından, mitotik indekste yaklaşık %50 oranında azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon yani, IC₅₀ değeri çalışmamızda en yüksek doz olarak seçilmiştir. Daha sonra en düşük doz ile ara doz belirlenmiştir. Dozlar belirlendikten sonra, insan akciğer hücre kültürleri etken madde için 3 farklı doz ile muamele edilmiştir. Çalışmalarda üç zaman noktası 24, 48 ve 72 saatlik uygulama süreleri kullanılmıştır. IC₅₀'ye göre belirlenen üç doza göre yapılacak olan testlerde sadece MTT testinde dördüncü doz olarak 2.5+37.5 µM (DEL+THIA karışımı) kullanılmış, GSH ve MDA testinde üç doz kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 IC₅₀ Değerini Bulmak İçin Hazırlanan Deltametrin / Thiaklopid Dozları

Dozlar	Deltametrin (1X)	Thiaklopid (7.5X)
1. DOZ	0.50 µM	7.50 µM
2. DOZ	1.25 µM	18.75 µM
3. DOZ	2.50 µM	37.50 µM
4. DOZ	5.00 µM	75.00 µM
5. DOZ	12.5 µM	187.50 µM
6. DOZ	25.00 µM	375.00 µM
7. DOZ	50.00 µM	750.00 µM
8. DOZ	100.00 µM	1500.00 µM
9. DOZ	150.00 µM	2250.00 µM
10. DOZ	200.00 µM	3000.00 µM

3.3.7 Deney Planı ve Grupları

Çalışmamızda iki kontrol (biri S9 içeren) ve altısı S9 içeren on iki insektisit karışımından oluşan deney grupları oluşturulmuştur:

Kontrol Grubu: Kültürler herhangi bir madde ilavesi yapılmaksızın 24, 48 ve 72 saatliğine inkübe edilmiştir.

S9 Fraksiyon Kontrol Grubu: Kültürlere sadece S9 metabolik aktivatör eklenip 24, 48 ve 72 saatliğine inkübe edilmiştir.

Deltametrin ve Thiaklopid Karışım Grubu: Doz belirlenmesi için yapılacak ön çalışma sonuçlarına göre karar verdiğimiz karışımın 3 farklı konsantrasyonları insan akciğer fibroblast hücre kültürlerine ilave edilmiştir ve kültürler 24, 48 ve 72 saatliğine inkübe edilmiştir. Test sürelerinin bitiminde deney durdurularak hasat işlemi gerçekleştirilecek ve çalışılacak kitlelere göre hücre süpernatantı ya da besiyeri elde edilmiştir. Hasat işlemi sonrasında kitlerin üretici firmalarının sağladığı test protokolü izlenerek veriler toparlanmıştır. Ayrıca insektisit karışımlarının

metabolitlerinin etkisini de gözlemek amacıyla tüm uygulamalar S9 karaciğer fraksiyonu varlığında da gerçekleştirilmiştir.

10 doz üzerinden yaptığımız MTT test sonuçlarından elde ettiğimiz verileri kullanarak dört farklı deltametrin + thiakloprid konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.2 Deltametrin / Thiakloprid IC₅₀'ye Göre Belirlenen Dozlar

	Deltametrin (µM)	Thiakloprid (µM)
1. DOZ	5.00	75.00
2. DOZ	12.50	187.50
3. DOZ	25.00	375.00

3.3.8 MTT Testi

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) bir tetrazolyum tuzudur. Heterosiklik bir yapısı olan organik bir bileşiktir. Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir. Hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksitesinin kantitasyonunu belirlemede kullanılır.

Çalışmamızda kullandığımız hücreler; 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ortam içerisinde belirli sayıda hücre olacak şekilde ekilmiştir. DEL ve THIA ile muameleleri yapıp belirlenen süre ve dozlar boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra test protokolünde belirtildiği gibi, her kuyucuğa 20 µL MTT solüsyonu eklenmiş ve 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1 dakika kadar kuyucuklar shakerda sallanarak absorbans değerleri mikroplyt okuyucu ile okunmuştur. Okunan absorbans değerlerine göre sitotoksite düzeyi belirlenmiştir. Deneylelerimizde hücre canlılığı yüzdesi MTT testi kullanılarak yapılmıştır. PBS tamponu (pH=7) içerisinde %5'lik MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Çözelti ışığa duyarlı olduğu için -4 °C'de karanlıkta saklanmıştır. İnsektisite maruz bırakılan hücrelerin kuyucuklarına 20 µl MTT çözeltisi eklenmiş ve kültür kapları (hücre kültürü) inkübatör içerisinde dört saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar içerisinde oluşan formazon kristallerine, karanlık ortamda, hazırlanan DMSO besiyeri karışımından eklenmiş ve al-ver yapılarak iyice karışması sağlanmıştır. 37

°C’de inkübatörde 15 dakika bekletilmiştir. Oluşan rengin şiddeti 570 nm’yi referans dalga boyu olarak ölçülmüştür. Absorbans değerlerinin ortalamaları alınmış ve blank (sadece besiyeri absorbans değeri) çıkarılarak değerlerin normalizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 GSH (Glutatyon) Testi

GSH memeli hücrelerinde radikal ve oksidatif hasara karşı korumada önemli bir rol oynayan düşük molekül ağırlıklı başlıca hücre içi tioldür. Test, toplam glutatyon veya indirgenmiş glutatyon miktarını analiz eden kolorimetrik bir metottur. Metot 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ve glutatyon redüktaz enzimlerinin glutatyonu (indirgenmiş/yükseltgenmiş formları arasında) dönüştürme sistemine dayanmaktadır (Rahman ve ark., 2007). Glutatyon DTNB ile reaksiyona girerek oksitlenir. Sonuçta glutatyon disülfid (GSSG) ve sarı renkli 2-nitro-5-thiobenzoik asit oluşur. 412 nm’de absorbans ölçülerek reaksiyonda kullanılan GSH konsantrasyonu belirlenebilir. Geri dönüşüm sistemi, oluşan GSSG’in, NADPH varlığında glutatyon redüktaz tarafından tekrar indirgenmiş glutatyon formuna (GSH) dönüşümünü sağlayarak toplam glutatyon belirleme hassasiyetini önemli ölçüde artırır. Belirlenen deney prosedürü izlenerek gerekli süreler sonunda üretici firmanın sağladığı test protokolü uygulanarak GSH tespiti yapılmıştır.

3.3.10 MDA (Lipit Peroksidasyon) Testi

Patofizyolojik süreçlerde lipit peroksidasyonunun miktarının belirlenmesi oksidatif stres değerlendirilmesi için esas teşkil etmektedir. Lipit peroksidasyonu doğal yan ürünler olarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) oluşturur. MDA eklentiler oluşturmak üzere DNA ile tepkimeye girer. Bu sebeple lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçülmesi oksidatif hasarın kullanışlı bir ölçütüdür. MDA seviyesi ölçülecek örneklerdeki MDA molekülleri Thiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer ve MDA-TBA eklentisini oluşturur. Daha sonra bu eklenti kolay bir şekilde 532 nm’de kolorimetrik olarak tayin edilebilir. Deneyler için belirlenen süreler sonunda hasatlanacak hücrelerden elde edilen süpernatant örneklerinde test protokolüne göre MDA seviyeleri tespit edilmiştir (Lapenna ve Cuccurullo, 1993; Marnett, 1999).

3.3.11 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılan tüm veriler c tekrarlı deney ortalamaları alınarak \pm standart hataları ile birlikte verilmiştir. Grupların negatif kontrol ile karşılaştırılması ve aralarındaki farklılıkları Anova tek yönlü varyans analiz metodu ve Student's t testi ile değerlendirilmiş olup, $p < 0.05$ olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Deney Dozları ve IC₅₀'nin Belirlendiği MTT Testi Sonuçları

MTT testi ile deneyin uygulama süreleri sonrasında kuyucuklarda mitokondriyal aktivitelere göre canlı hücrelerin oranı belirlenmektedir. Bu test öncelikle ilgili insektisit karışımlarının deney dozlarının belirlenebilmesi amacıyla hazırlanan bir doz skalası ve deney süreleri için uygulanmıştır (Çizelge 4.1). Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarına besiyeri içerisinde 12.500 insan akciğer fibroblast (hTERT WHTBF-6) hücresi olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

Hücreler kuyucuklara 3 tekrarlı olarak ekilmiştir. Ekimden sekiz saat sonra protokol doğrultusunda hazırlanan Deltametrin ve Thiaklopid doz karışımları kuyucuklar içerisine eklenmiştir. Hücreler insektisit karışımları içerisinde 24, 48 ve 72 saatlik süreyle 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Süreler sonunda MTT protokol uyarınca işlemler gerçekleştirilmiş ve mikropłaka okuyucu ile 570 nm'de absorbansları okunmuştur. Okunan absorbans değerlerinin ortalamaları alınarak bunlardan blank değeri (sadece besiyeri konan kuyucuklara besiyeri uzaklaştırılarak eklenen çözücü (DMSO)'nün absorbans değeri) çıkarılıp normalizasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 24 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank)=Normalizasyon
Deltametrin	Thiaklopid		
	Kontrol	0.334±0.0210	0.273
0.50	7.50	0.307±0.0435	0.246
1.25	18.75	0.290±0.0552	0.230
2.50	37.50	0.259±0.1026	0.199
5.00	75.00	0.294±0.0908	0.233
12.50	187.50	0.244±0.1180	0.183
25.00	375.00	0.278±0.0992	0.218
50.00	750.00	0.253±0.0483	0.192
100.00	1500.00	0.234±0.0519	0.174
150.00	2250.00	0.212±0.0505	0.152
200.00	3000.00	0.184±0.0328	0.124
	Blank	0.060±0.0006	0.000

Çizelge 4.2 48 Saat Uygulamada İnektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank)=Normalizasyon
Deltametrin	Thiaklopid		
Kontrol		0.289±0.0389	0.231
0.50	7.50	0.257±0.0297	0.200
1.25	18.75	0.250±0.0411	0.192
2.50	37.50	0.240±0.0855	0.182
5.00	75.00	0.246±0.0354	0.189
12.50	187.50	0.237±0.0731	0.179
25.00	375.00	0.219±0.0497	0.161
50.00	750.00	0.191±0.0647	0.133
100.00	1500.00	0.138±0.0329	0.081
150.00	2250.00	0.114±0.0208	0.056
200.00	3000.00	0.090±0.1139	0.032
Blank		0.057±0.0006	0.000

Çizelge 4.3 72 Saat Uygulamada İnektisit Karışımının Dozlarına Göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank)=Normalizasyon
Deltametrin	Thiaklopid		
Kontrol		0.495±0.0411	0.437
0.50	7.50	0.417±0.0692	0.359
1.25	18.75	0.374±0.0458	0.316
2.50	37.50	0.388±0.0638	0.330
5.00	75.00	0.374±0.0353	0.316
12.50	187.50	0.356±0.0539	0.298
25.00	375.00	0.311±0.0450	0.253
50.00	750.00	0.214±0.0502	0.156
100.00	1500.00	0.120±0.0227	0.062
150.00	2250.00	0.075±0.0309	0.017
200.00	3000.00	0.087±0.0182	0.029
Blank		0.058±0.0006	0.000

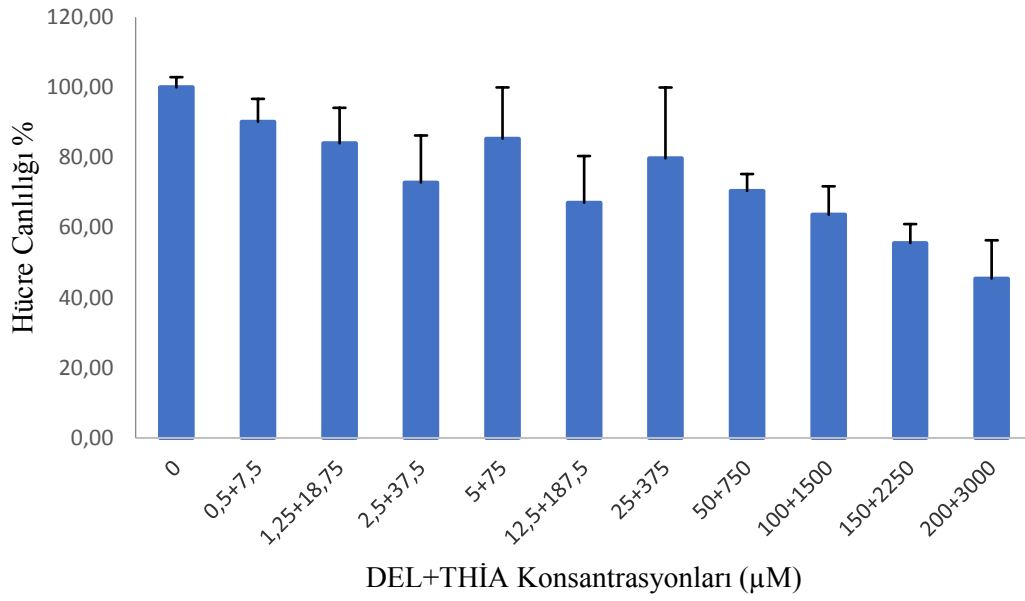
24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde hTERT WHTBF-6 hücrelerinin canlılık değerleri aşağıdaki formül ile hesaplanarak belirlenmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ortalama Doğrulanmış İlaçlı Kuyucuğun Absorbans Değeri}}{\text{Ortalama Doğrulanmış Kontrol Kuyucuğun Absorbans Değeri}} \times 100 \quad (1)$$

Bu değerlere göre, 24, 48 ve 72 saat uygulama sürelerinde DEL+TH1A insektisit karışımının test edildiği insan akciğer fibroblastlarında hücre canlılık verileri ayrı ayrı çizelgelerde ve bu bulgulara dayanarak çizilen grafiklerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri

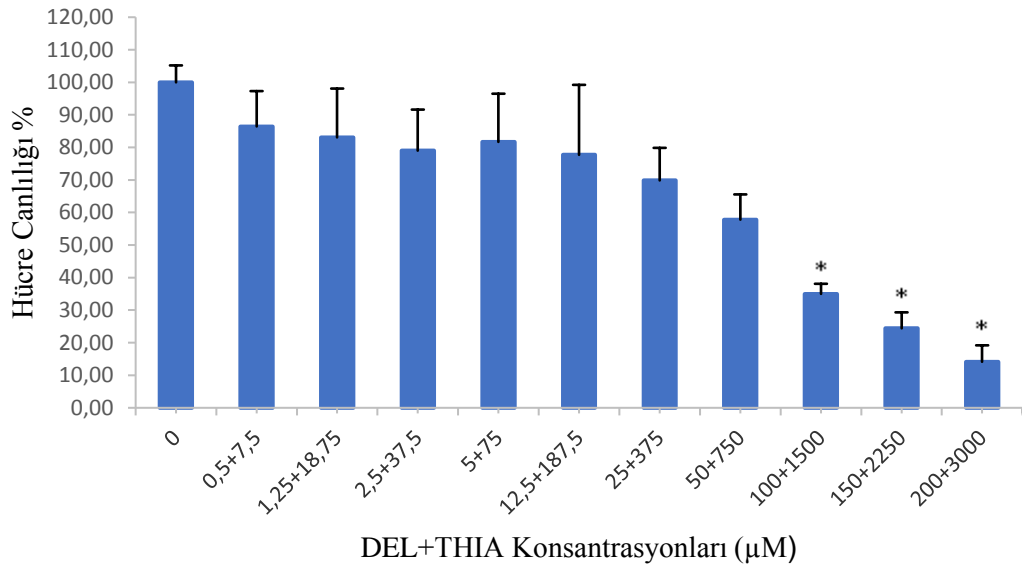
Konsantrasyonlar (µM)		24 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Hücre canlılığı (%)±SE
	Kontrol	100±2.9
0.50	7.50	90.21±6.5
1.25	18.75	84.06±10.1
2.50	37.50	72.87±13.4
5.00	75.00	85.38±14.6
12.50	187.50	67.11±13.3
25.00	375.00	79.76±20.2
50.00	750.00	70.48±4.8
100.00	1500.00	63.68±8.1
150.00	2250.00	55.60±5.4
200.00	3000.00	45.48±10.9



Şekil 4.1 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Çizelge 4.5 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 48 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri

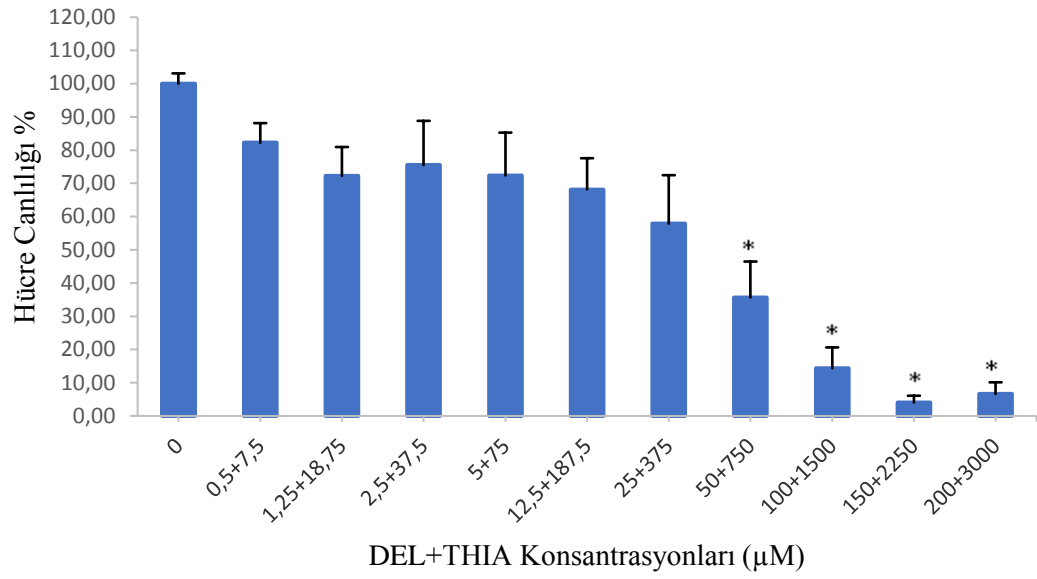
Konsantrasyonlar (µM)		48 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Hücre canlılığı (%)±SE
Kontrol		100±5.2
0.50	7.50	86.45±10.85
1.25	18.75	83.08±15
2.50	37.50	79.02±12.6
5.00	75.00	81.70±14.8
12.50	187.50	77.72±21.5
25.00	375.00	69.86±10
50.00	750.00	57.81±7.75
100.00	1500.00	35.00±3.1
150.00	2250.00	24.42±4.9
200.00	3000.00	14.14±5.05



Şekil 4.2 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 48 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

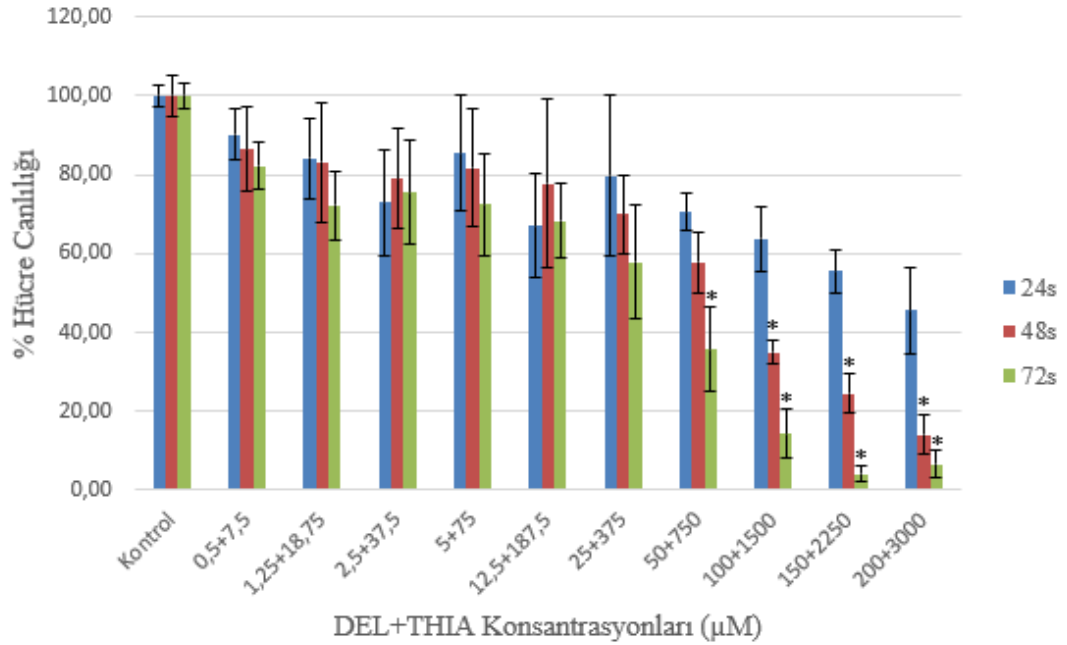
Çizelge 4.6 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 72 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		72 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Hücre canlılığı (%)±SE
Kontrol		100±3.1
0.50	7.50	82.23±5.9
1.25	18.75	72.24±8.7
2.50	37.50	75.51±13.3
5.00	75.00	72.38±12.9
12.50	187.50	68.15±9.42
25.00	375.00	57.86±14.6
50.00	750.00	35.67±10.8
100.00	1500.00	14.37±6.25
150.00	2250.00	4.07±2.02
200.00	3000.00	6.63±3.5



Şekil 4.3 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 72 Saat Uygulamaya Ait Hücre Canlılığı Değerleri Grafiği [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)

24, 48 ve 72 saat uygulama süresine göre hesaplanan hücre canlılıkları ortak bir grafikte ele alınarak karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.4).

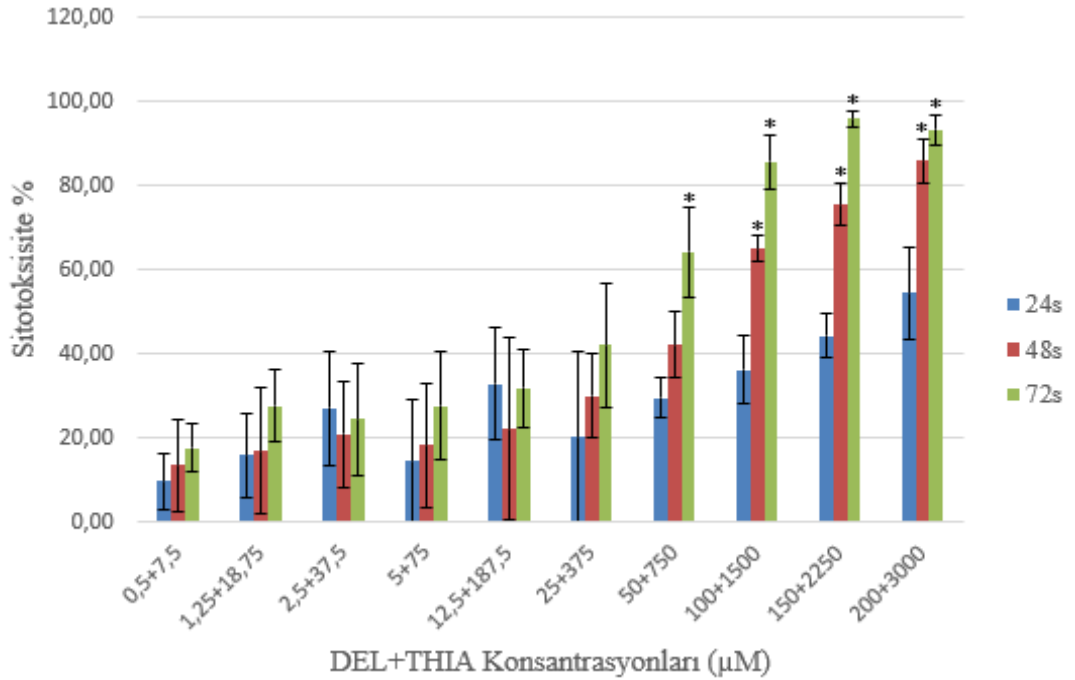


Şekil 4.4 24, 48 ve 72 Saat Uygulamalarında Kontrole Göre Hücre Canlılığının (%) İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi

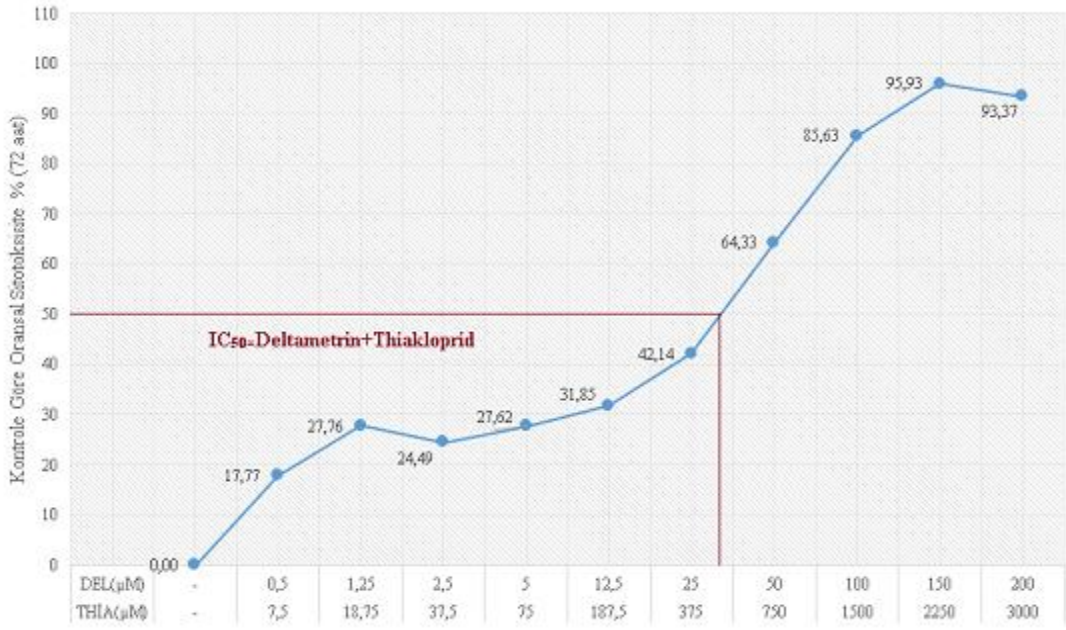
Ayrıca, hücre canlılık verilerinden elde edilen sitotoksisite değerleri tüm süreler için belirlenip ortak bir çizelgede ele alınmış (Çizelge 4.7) ve sitotoksisite seviyeleri tek bir grafikte gösterilerek karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.5).

Çizelge 4.7 24, 48 ve 72 Saat'lik Uygulamaların Hücre Canlılık Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)		24 saat	48 saat	72 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Sitotoksisite (%)	Sitotoksisite (%)	Sitotoksisite (%)
Kontrol	Kontrol	0.00	0.00	0.00
0.50	7.50	9.79	13.55	17.77
1.25	18.75	15.94	16.92	27.76
2.50	37.50	27.13	20.98	24.49
5.00	75.00	14.62	18.30	27.62
12.50	187.50	32.89	22.28	31.85
25.00	375.00	20.24	30.14	42.14
50.00	750.00	29.52	42.19	64.33
100.00	1500.00	36.32	65.00	85.63
150.00	2250.00	44.40	75.58	95.93
200.00	3000.00	54.52	85.86	93.37



Şekil 4.5 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksisite Değerleri



Şekil 4.6 72 Saatlik Uygulama Sonrası İnektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Sitotoksosite Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Deltametrin ve thiakloprid karışımının insan akciğer fibroblast hücrelerinde belirlenen 10 dozda ve 24, 48 ve 72 saat uygulama sürelerinde sitotoksik olduğu belirlenmiştir. İnektisit karışımı hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak düşürmüştür.

24 saatlik MTT uygulaması sonucu WHTBF-6 hücrelerinin sağkalımı doza bağlı azalmıştır. Hücre canlılığındaki bu düşüş ancak yüksek dozlarda %50 canlılığa ulaşmış olup, en yüksek dozda (sırasıyla DEL+THIA, 200+3000 µM) %50'nin altına düşmüştür. Bununla birlikte dozlarda hücre canlılığında gözlenen bu azalış kontrole göre istatistiksel anlamda ($p < 0,05$) farklı bulunmamıştır (Şekil 4.1).

İnektisit karışımının 10 dozu ile 48 saat maruziyet süresi sonunda uygulanan MTT testi ile benzer bir şekilde doza bağlı sitotoksosite artışı tespit edilmiştir. Orta dozlara kadar düşük seviyede seyreden sitotoksosite değerleri (sırasıyla DEL+THIA) 50+750 µM'lık dozdan itibaren ve özellikle en yüksek üç dozda önceki dozlara göre daha ciddi artış göstermiştir. 48 saat deney süresinde hücre canlılığında gözlenen bu düşüşler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ($p < 0,05$), 100+1500, 150+2250 ve 200+3000 µM şeklindeki en yüksek üç DEL+THIA karışım dozunda kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2).

DEL+THIA insektisit karışımının WHTBF-6 insan akciğer fibroblast hücrelerinde 72 saat zaman noktasında sitotoksik etkisinin belirlenmesi için yapılan MTT testi ile doza bağlı bir etki artışı gözlenirken aynı zamanda bu en uzun uygulama süresine göre ilgili insektisit karışımının söz konusu hücrelerde IC₅₀ (IC= İnhibisyon Konsantrasyonu 50, hücre sayısını yarıya indiren doz) değeri de belirlenmiştir. Bu sürede hücre canlılığındaki azalış düşük dozlarda dahi diğer uygulama sürelerine göre fazla olmuştur. Bunun yanında, 10 dozluk skala göz önüne alındığında 6. doz ve sonraki yüksek dört dozda da WHTBF-6 hücrelerinin sağkalım oranları dramatik bir şekilde düşmüştür. Bu dozlarda ortaya çıkan sitotoksosite seviyeleri kontrol ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (p<0,05). Bu dozlar sırasıyla, 50+750, 100+1500, 150+2250 ve 200+3000 µM DEL+THIA şeklindedir (Şekil 4.3). IC₅₀ değeri ise 32 µM DEL + 481 µM THIA olarak belirlenmiş olup, 72 saatlik maruziyet için test edilen doz skalasında hücre canlılığının dramatik olarak düşmeye başladığı 6. ve 7. dozlar arasında yer almaktadır (Şekil 4.3).

Tezde üç zaman noktası için uygulanan insektisit konsantrasyonlarının sitotoksosite seviyeleri ve 72 saat uygulaması sonucu belirlenen IC₅₀ değeri dikkate alındığında; 25+375 µM (Deltametrin + Thiakloprid) konsantrasyonu, MTT, GSH ve MDA testleri için en yüksek doz olarak belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek doza ek olarak 12,5+187,5 µM / 5+75 µM / 2,5+37,5 µM şeklinde üç doz daha MTT test tekrarı için seçilmiştir. Bununla birlikte, GSH ve MDA testleri için ise 25+375 µM'lık yüksek dozun yanında, 12,5+187,5 µM'lık konsantrasyonu ara doz olarak ve 5+75 µM'lık DEL+THIA karışımı düşük doz olarak deney dozları olacak şekilde belirlenmiştir. Belirlenen bu dozlarda ve üç deney süresinde MTT sitotoksosite belirlemek amacıyla tekrar edilirken, oksidatif stress belirteçleri olan GSH ve MDA testleri de 3 kez tekrarlanarak uygulanmıştır.

4.1.1 IC₅₀'ye Göre Belirlenen Dozlar ile Yapılan MTT Testi Sonuçları

Belirlenen dört doz kullanılarak, 24 saat, 48 saat ve 72 saat sureyle insektisit karışımına maruz bırakılan hücrelerde insektisit karışımının sitotoksik etkisi S9'lu ve S9'suz olarak ayrı ayrı tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). MTT testi uygulamaları sonucu elde edilen absorban değerlerinin normalizasyon işlemleri sonrasında hücre canlılıkları % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.8 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri
(24 saat)

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
Kontrol		0.467±0.0175	0.406
2.50	37.50	0.398±0.0219	0.338
5.00	75.00	0.394±0.0103	0.333
12.50	187.50	0.390±0.0558	0.332
25.00	375.00	0.338±0.0354	0.278
Blank		0.060±0.0006	0.000
S9 Fraksiyon			
Kontrol	Kontrol	0.338±0.0098	0.278
2.50	37.50	0.324±0.0483	0.264
5.00	75.00	0.339±0.0749	0.279
12.50	187.50	0.310±0.0695	0.249
25.00	375.00	0.319±0.0319	0.258
Blank		0.060±0.0006	0.000

Çizelge 4.9 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri
(48 saat)

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
Kontrol		0.480±0.0107	0.419
2.50	37.50	0.396±0.0336	0.336
5.00	75.00	0.388±0.0752	0.327
12.50	187.50	0.340±0.0826	0.275
25.00	375.00	0.338±0.0354	0.290
Blank		0.060±0.0006	0.060
S9 Fraksiyon			
Kontrol	Kontrol	0.317±0.0109	0.256
2.50	37.50	0.320±0.0484	0.259
5.00	75.00	0.272±0.0361	0.211
12.50	187.50	0.255±0.0287	0.194
25.00	375.00	0.224±0.0205	0.163
Blank		0.060±0.0006	0.000

Çizelge 4.10 S9'lu ve S9'suz Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri (72 Saat)

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm±SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
Kontrol		0.655±0.0180	0.583
2.50	37.50	0.573±0.0125	0.500
5.00	75.00	0.511±0.0103	0.439
12.50	187.50	0.048±0.0352	0.409
25.00	375.00	0.338±0.0256	0.356
Blank		0.060±0.0006	0.060
S9 Fraksiyon			
Kontrol		0.680±0.0076	0.607
2.50	37.50	0.380±0.0379	0.307
5.00	75.00	0.375±0.0539	0.303
12.50	187.50	0.296±0.0335	0.223
25.00	375.00	0.279±0.0182	0.207
Blank		0.072±0.0006	0.000

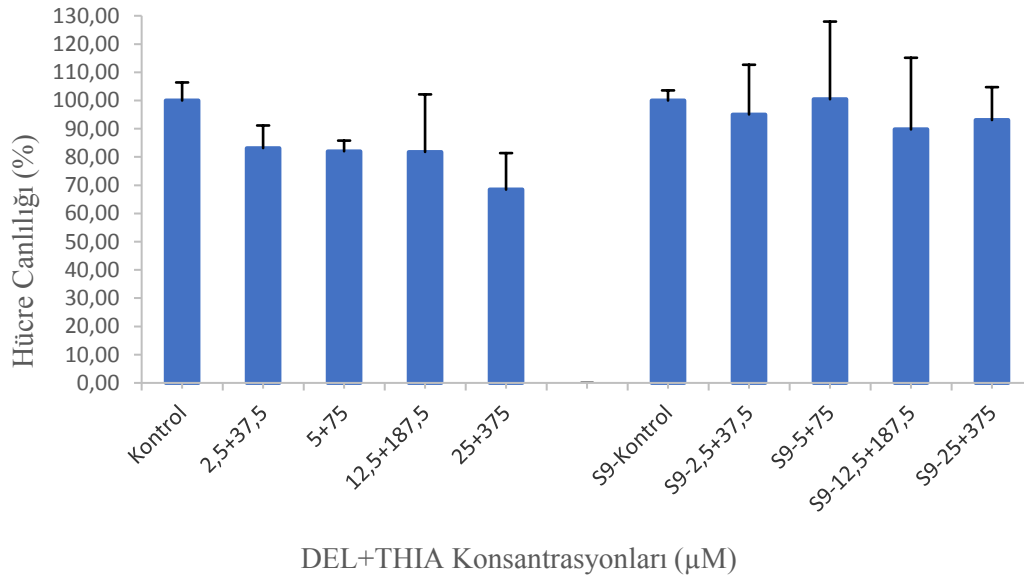
Çizelge 4.11 S9'lu ve S9'suz 24, 48 ve 72 saatlik Uygulamalardaki Hücre Canlılığı Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		24 saat	48 saat	72 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Hücre Canlılığı (%)±SE	Hücre Canlılığı (%)±SE	Hücre Canlılığı (%)±SE
Kontrol		100±6.39	100±3.91	100±6.57
2.50	37.50	83.16±8.0	80.10±12.3	85.80±4.56
5.00	75.00	82.03±3.77	78.15±27.45	75.31±3.76
12.50	187.50	81.78±20.38	65.71±30.15	70.20±12.85
25.00	375.00	68.46±12.92	54.65±12.9	48.50±9.35
Blank		0.00	0.00	0.00
S9 Fraksiyon				
Kontrol		100±3.58	100±3.98	100±2.78
2.50	37.50	95.06±17.6	101.17±6.72	50.64±13.85
5.00	75.00	100.45±27.5	82.49±13.2	49.89±19.68
12.50	187.50	89.75±25.38	75.71±16.7	36.86±12.25
25.00	375.00	93.08±11.65	63.73±7.48	34.10±6.64
Blank		0.00	0.00	0.00

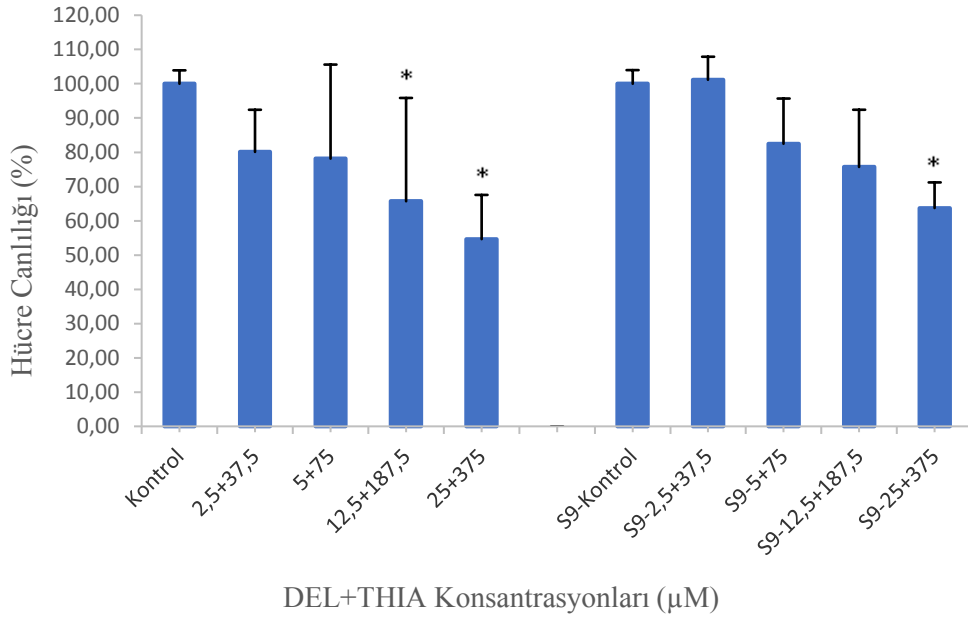
Çizelge 4.12 S9'lu ve S9'suz 24, 48 ve 72 Saat'lik Uygulamaların Hücre Canlılık Verilerinden Hesaplanan Sitotoksosite Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		24 saat	48 saat	72 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Sitotoksosite (%)	Sitotoksosite (%)	Sitotoksosite (%)
Kontrol		0.00	0.00	0.00
2.50	37.50	16.84	19.90	14.20
5.00	75.00	17.97	21.85	24.69
12.50	187.50	18.22	34.29	29.80
25.00	375.00	31.54	45.35	51.41
Blank		0.00	0.00	0.00
S9 Fraksiyon				
Kontrol		0.00	0.00	0.00
2.50	37.50	4.94	-1.17	49.36
5.00	75.00	-0.45	17.51	50.11
12.50	187.50	10.25	24.29	63.14
25.00	375.00	6.92	36.27	65.90
Blank		0.00	0.00	0.00

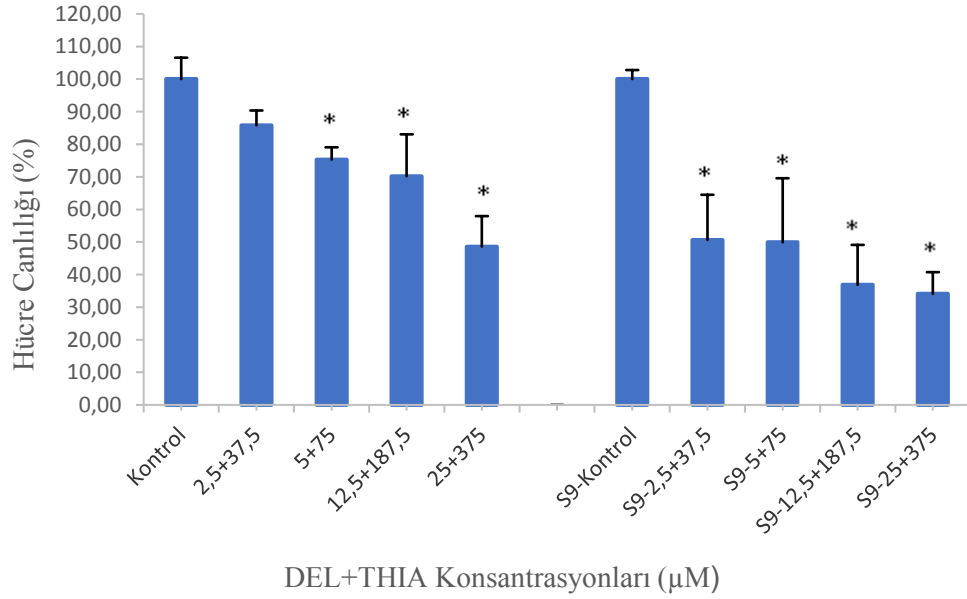
Çizelge 4.11'de belirtilen hücre canlılığı verileri kullanılarak, deltametrin ve thiakloprid karışımlarının hücre canlılıklarına etkileri, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar için ayrı ayrı grafiklendirilmiştir (Şekil 4.7)



Şekil 4.7 WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (24 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)



Şekil 4.8 WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (48 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)



Şekil 4.9 WHTBF-6 Hücrelerinde İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Oransal Canlılık Değişimi (72 Saat) [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)

Deney dozlarını belirlemek için yaptığımız hücre canlılığı ölçümü sonucu 4 doz için yapılan MTT testinin 24 saatlik sonuçlarına göre, S9'suz deney grubunda hücre canlılığında doza bağlı hafif bir düşüş görülmüştür. Bununla beraber S9'lu grupta 2.5+37.5 µM'lık ilk dozda hafifçe azalan hücre canlılığı ikinci dozda tekrar

yükselmiş ve son iki dozda ise tekrar düşüş göstermiştir. S9'lu grupta hücre canlılığındaki bu değişim doza bağlı bir şekilde seyretmemiştir. Ayrıca her iki gruptaki dozlarda da düşüşler kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır ($p<0.05$).

MTT testinin 48 saatlik sonuçlarından S9 Fraksiyonu içermeyen grubun en yüksek iki dozunun 12.5+187.5 ve 25+375 μ M hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel anlamda önemli ölçüde düşürdüğü belirlenmiştir ($p<0.05$). S9 Fraksiyonu içermeyen insektisit karışımı uygulamasındaki sitotoksosite seviyelerindeki doza bağlı bu artış, S9 Fraksiyonu içeren dozlarda da tespit edilmesine rağmen, bu grupta hücre canlılığındaki değişim kontrolden istatistiksel anlamda farklı görülmemiştir. En yüksek dozun hücre canlılığı ile kontrol arasındaki fark ise anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Yine de S9'lu karışımın 48 saat uygulaması WHTBF-6 hücrelerinde S9'suz grup kadar sitotoksik etki göstermemiştir

İnsan akciğer fibroblast hücre hattının DEL+THIA insektisit karışımına maruz bırakıldığı son süre olan 72 saatlik uygulamanın MTT sonuçlarında önceki zaman noktalarının sonuçlarına benzer bir şekilde S9'suz karışımların ilk doz hariç sitotoksik seviyeleri artarak doza bağlı bir şekilde değişim göstermiştir. Bu grupta üç uygulama süresi göz önüne alındığında doza ve zamana bağlı bir etki söz konusudur. Diğer taraftan, 72 saat S9'lu grubun sitotoksosite verileri 24 saat ve 48 saat test sonuçlarından farklılık göstermiş ve ilk defa bu sürede S9'suz gruptan daha yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu gruptaki her dozun hücre canlılığı S9'suz grubun ilgili dozundan daha düşük belirlenmiştir. Ayrıca S9'lu grubun tüm dozları kendi kontrolü ile kıyaslandığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p<0.05$) olup sitotoksitedeki artış doza bağlı gerçekleşmiştir. S9'lu grubun tüm zaman noktaları incelendiğinde hücre canlılığında zamana bağlı bir azalış görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar, söz konusu deney koşullarında test edilen deltametrin ve thiaklopid karışımının hTERT WHTBF-6 hücreleri üzerine sitotoksik potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır. Deltametrin ve thiaklopid karışımının sitotoksik etkisi, doza ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Deltametrin ve thiaklopid karışımının hTERT WHTBF-6 hücrelerine akut muamelesinde ana bileşiklerin kısa süre içinde hücre canlılığını düşürse de uzun sürelerde veya kronik muamelede

metabolitlerinin etkili olduğu ve sitotoksisiteyi daha dramatik şekilde artırdığı anlaşılmaktadır.

4.2 GSH Testi Sonuçları

Yapılan MTT testi sonuçları ile belirlenen üç doz kullanılarak, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle insektisit karışımına maruz bırakılan hücrelerde insektisit karışımının GSH miktarına etkisi tespit edilmiştir. GSH testi uygulamaları sonucu elde edilen veriler ELIZA okuyucuda beş dakika arayla üç kere okutulmuştur.

Çizelge 4.13 24 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)		OD 412nm	OD 412 nm	OD 412 nm	Ortalama OD 412 nm \pm SE
Deltametrin	Thiaklopid				
Kontrol		3.189	4.225	3.562	3.66 \pm 0.175
5.00	75.00	2.993	3.290	4.318	3.53 \pm 0.232
12.50	187.50	2.871	3.896	3.259	3.34 \pm 0.173
25.00	375.00	4.065	3.387	2.294	3.25 \pm 0.298
S9 Fraksiyon					
Kontrol		4.043	3.738	3.435	3.74 \pm 0.101
5.00	75.00	3.177	3.792	3.306	3.43 \pm 0.108
12.50	187.50	3.087	3.580	2.975	3.21 \pm 0.108
25.00	375.00	2.859	3.241	2.929	3.01 \pm 0.107

Çizelge 4.14 48 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 412nm	OD 412 nm	OD 412 nm	Ortalama OD 412 nm±SE
Deltametrin	Thiaklopid				
Kontrol		3.492	3.725	3.162	3.46±0.094
5.00	75.00	2.653	3.088	3.164	2.97±0.092
12.50	187.50	3.152	2.427	3.559	3.05±0.191
25.00	375.00	2.365	2.672	2.946	2.66±0.097
S9 Fraksiyon					
Kontrol		3.381	2.983	3.719	3.36±0.123
5.00	75.00	2.774	3.795	2.106	2.89±0.284
12.50	187.50	2.386	2.006	3.072	2.49±0.284
25.00	375.00	2.856	2.225	1.793	2.29±0.180

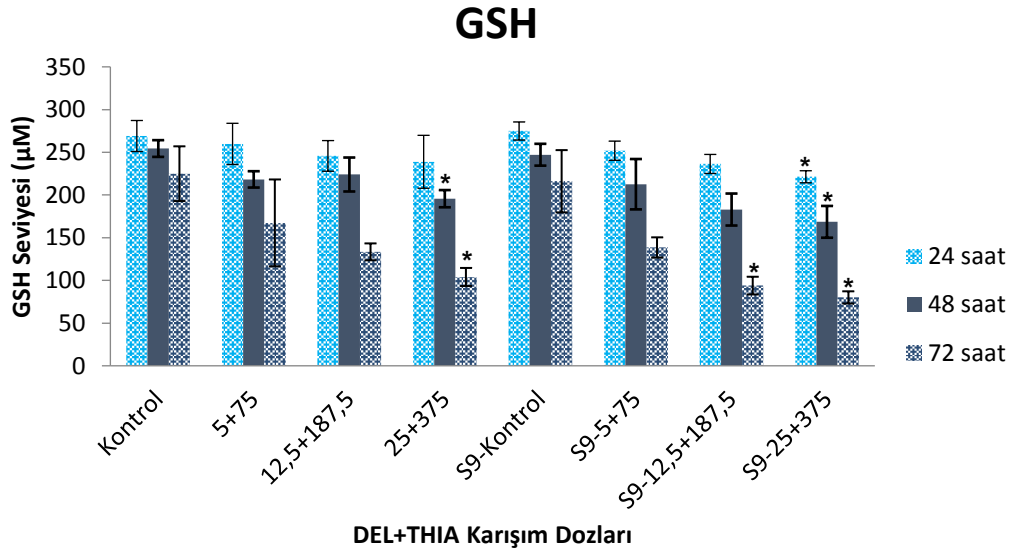
Çizelge 4.15 72 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu GSH Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 412nm	OD 412 nm	OD 412 nm	Ortalama OD 412 nm±SE
Deltametrin	Thiaklopid				
Kontrol		3.889	3.225	2.062	3.06±0.308
5.00	75.00	1.938	3.882	1.006	2.28±0.489
12.50	187.50	1.357	2.327	1.759	1.81±0.162
25.00	375.00	1.761	1.187	1.294	1.41±0.102
S9 Fraksiyon					
Kontrol		3.949	1.849	3.017	2.94±0.351
5.00	75.00	1.527	1.921	2.206	1.88±0.114
12.50	187.50	0.985	1.263	1.583	1.28±0.114
25.00	375.00	1.096	0.876	1.291	1.09±0.100

Çizelge 4.16 24, 48 ve 72 Saatlik Uygulamalarda S9'suz ve S9'lu Test Sonucu Hesaplanan GSH Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		24 saat GSH±SE	48 saat GSH±SE	72 saat GSH±SE
Deltametrin	Thiakloprid			
Kontrol		269.02±18.19	254.39±9.81	224.90±32.06
5.00	75.00	259.83±24.10	218.26±9.56	167.30±50.86
12.50	187.50	245.74±17.94	223.97±19.88	133.41±9.88
25.00	375.00	238.87±30.97	195.66±10.08	103.97±10.58
S9 Fraksiyon				
Kontrol		274.90±10.54	247.13±12.77	216.05±36.47
5.00	75.00	251.84±11.24	212.62±29.49	138.58±11.82
12.50	187.50	236.32±11.16	182.94±18.73	93.90±10.37
25.00	375.00	221.30±7.05	168.55±18.59	80.05±7.14

Çizelgelerde belirtilen veriler kullanılarak, deltametrin ve thiakloprid karışımlarının GSH seviyesine etkileri, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar için tek bir grafik halinde gösterilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 24, 48, 72 Saatlik Uygulamaların S9'lu ve S9'suz Olarak Kontrole Göre GSH Seviyelerinin İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)

24 saatlik uygulamada doz artışına bağlı olarak GSH miktarında hafif azalmıştır. Ancak sadece S9'lu en yüksek doz olan 25+375 µM hücrelerin GSH miktarında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu grlmştir (p<0.05).

24 ve 48 saatlik S9'lu ve S9'suz uygulamalarda DEL+THIA karışımı en düşük iki doz olan 5+75 ve 12.5+187.5 µM konsantrasyonlarda GSH miktarında görülen azalmalar, çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığıında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

48 ve 72 saatlik S9'lu ve S9'suz uygulamada deltametrin ve thiaklopid karışımı en yüksek dozlarının insan hTERT WHTBF-6 akciğer fibroblast hücrelerinde GSH miktarında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu grlmştir (p<0.05). Bu azalmanın konsantrasyon artışı ile orantılı olarak gerçekleştiği ve artan karışım konsantrasyonuna paralel olarak GSH miktarının azaldığı görülmektedir.

72 saatlik S9'lu ve S9'suz uygulamada doz artışına bağlı olarak GSH miktarı azalmıştır. Ancak S9'suz 5+75 ve 12.5+187.5 µM karışım konsantrasyonlarında ve S9'lu 5+75 µM GSH miktarında görülen azalmalar, çözücü kontrol grubu ile kıyaslandığıında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Buna rağmen çalışmalarımızda kullandığımız en yüksek doz olan S9'lu ve S9'suz 25+375 µM'lık DEL+THIA konsantrasyonunun ve S9'lu 12.5+137.5 µM 'lık DEL+THIA konsantrasyonunun hTERT WHTBF-6 hücrelerinde GSH miktarını anlamlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir (p<0.05).

4.3 MDA Testi Sonuçları

Yapılan MTT testi sonuçları ile belirlenen üç doz kullanılarak, 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle insektisit karışımına maruz bırakılan hücrelerde insektisit karışımının MDA miktarına etkisi tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17 24 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)		OD 532nm	OD 532 nm	OD 532 nm	Ort.OD 532 nm \pm SE
Deltametrin Thiakloprid					
Kontrol		0.181	0.223	0.233	0.21 \pm 0.083
5.00	75.00	0.199	0.200	0.205	0.20 \pm 0.009
12.50	187.50	0.186	0.252	0.219	0.22 \pm 0.100
25.00	375.00	0.218	0.201	0.253	0.22 \pm 0.080
S9 Fraksiyon					
Kontrol		0.201	0.219	0.251	0.22 \pm 0.077
5.00	75.00	0.205	0.280	0.234	0.24 \pm 0.115
12.50	187.50	0.306	0.199	0.227	0.24 \pm 0.168
25.00	375.00	0.231	0.274	0.262	0.26 \pm 0.067

Çizelge 4.18 48 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (μM)		OD 532nm	OD 532 nm	OD 532 nm	Ort.OD 532 nm
Deltametrin Thiakloprid					
Kontrol		0.152	0.225	0.170	0.18 \pm 0.115
5.00	75.00	0.179	0.204	0.177	0.19 \pm 0.045
12.50	187.50	0.116	0.205	0.233	0.18 \pm 0.185
25.00	375.00	0.151	0.256	0.283	0.23 \pm 0.212
S9 Fraksiyon					
Kontrol		0.279	0.208	0.291	0.26 \pm 0.136
5.00	75.00	0.198	0.371	0.227	0.27 \pm 0.281
12.50	187.50	0.336	0.320	0.305	0.32 \pm 0.047
25.00	375.00	0.375	0.380	0.373	0.38 \pm 0.011

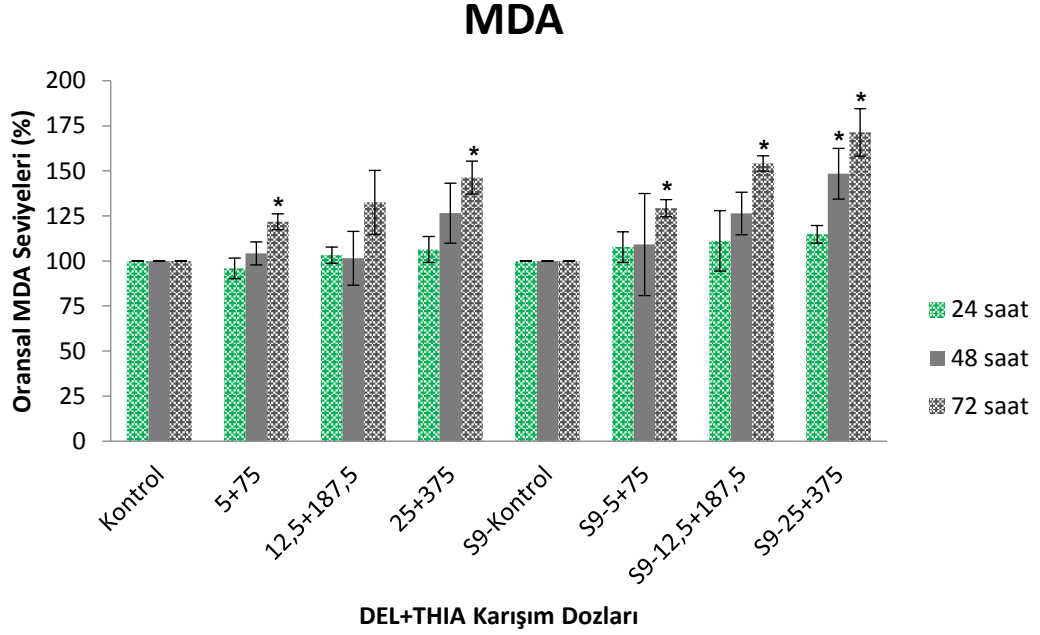
Çizelge 4.19 72 Saatlik Uygulamada S9'suz ve S9'lu MDA Testi Sonucu Hesaplanan OD Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		OD 532nm	OD 532 nm	OD 532 nm	Ort.OD 532 nm
Deltametrin	Thiaklopid				
Kontrol		0.206	0.211	0.189	0.20±0.035
5.00	75.00	0.255	0.274	0.211	0.25±0.098
12.50	187.50	0.216	0.370	0.222	0.27±0.265
25.00	375.00	0.264	0.304	0.315	0.29±0.081
S9 Fraksiyon					
Kontrol		0.282	0.265	0.214	0.25±0.107
5.00	75.00	0.371	0.318	0.339	0.34±0.0.81
12.50	187.50	0.430	0.412	0.462	0.43±0.077
25.00	375.00	0.421	0.429	0.434	0.43±0.019

Çizelge 4.20 24, 48, 72 Saatlik Uygulamalarda S9'suz ve S9'lu Hesaplamalar Sonucu MDA Değerleri

Konsantrasyonlar (µM)		24 saat % MDA±SE	48 saat % MDA±SE	72 saat % MDA±SE
Deltametrin	Thiaklopid			
Kontrol		100±0	100±0	100±0
5.00	75.00	95.87±5.75	104.18±6.38	121.76±4.37
12.50	187.50	103.25±4.48	101.49±14.93	132.55±17.72
25.00	375.00	106.38±7.19	126.53±16.65	146.29±9.12
S9 Fraksiyon				
Kontrol		100±0	100±0	100±0
5.00	75.00	107.69±8.48	109.11±28.32	129.30±4.74
12.50	187.50	111.18±16.76	126.36±11.80	154.13±4.23
25.00	375.00	114.80±4.88	148.42±14.06	171.32±13.18

Çizelgelerde belirtilen veriler kullanılarak, deltametrin ve thiakloprid karışımlarının MDA seviyesine etkileri, 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar için tek bir grafik halinde gösterilmiştir. (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 24, 48, 72 Saatlik Uygulamaların S9’lu ve S9’suz Olarak Kontrole Göre MDA Seviyelerinin İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi [*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)

24 saatlik uygulamada, DEL+THIA karışımının S9’suz 12.5+187.5 ve 25+375 μ M, S9’lu tüm konsantrasyonlarının hücrelerde MDA miktarını artırdığı görülmüş ancak lipit peroksidasyon miktarındaki artışlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır.

hTERT WHTBF-6 hücrelerine 48 saatliğine uygulanan DEL+THIA karışımının MDA miktarını artırdığı görülmüştür. Ancak MDA miktarında görülen bu artışlar DEL+THIA karışımının S9’lu en yüksek doz olan 25+375 μ M konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Aynı zamanda 72 saatlik uygulamalarda DEL+THIA karışımının tüm konsantrasyonlarının hTERT WHTBF-6 hücrelerinde MDA miktarını artırdığı görülmüş ve sadece S9’suz 12.5+187.5 μ M olan konsantrasyonundaki artış anlamlı

bulunmamış ve diğer dozların hepsinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

4.4 Sitotoksosite ve Oksidatif Stres

Çalışmamızda, neonikotinoit insektisit grubuna giren thiakloprid ile piretroit insektisit grubuna giren deltametrin insektisitlerinin karışım halinde kullanıldıkları zaman insan akciğer fibroblast hücrelerindeki hücre canlılığı ve oksijen metabolizması üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamıza konu olan insektisit karışımı ile yapılan toksisite çalışmaları yok denecek kadar azdır. Bu bileşikleri tek tek araştıran çalışmalar mevcut olup, bunun dışında ayrı ayrı her iki insektisit grubuna giren başka maddelerle de çalışmalar bulunmaktadır. Bu sebeple, tezin bu kısmında sonuçlarımız deltametrin-thiakloprid karışımını içeren çalışmaların dışında bileşiklerin tek başlarına incelendiği çalışmalarla veya aynı gruptaki benzer bileşiklerle ve/veya karışımlarla yapılmış araştırmalar ele alınarak tartışılacaktır.

Çalışmamızda kullanılan insektisit karışımının bir üyesi olan deltametrin ile ilgili araştırmalar uzun yıllar öncesine dayanmakta olup bileşik pek çok yönüyle incelenmiştir. Bu incelemelerin öncüllerinden biri Baeza-Squiban ve arkadaşlarının yayımladıkları çalışmadır. Araştırmacılar deltametrinin ticari formülasyonunun 50 ve 500 μM 'lık konsantrasyonlarını fare fibroblast hücre kültüründe 72 saat için test etmişler ve fare fibroblastlarında doza bağlı proliferasyon azalışı gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada insektisit ticari formülasyonunun hazırlandığı matriksin deltametrinin hücreye girişini kolaylaştırdığı kontrollü deneylerle ortaya çıkarılmıştır. *In vitro* çalışma olması ve sonucu çalışmamıza benzer olup ticari formülasyon kullanılarak bu etkinin görülmesi, çalışmamızda saf etken maddenin daha düşük konsantrasyonlarda belirlenen sitotoksik potansiyeli ile uyumludur (Baeza-Squiban ve ark.,1987).

Erkek sıçanların deltametrine maruz kalması nedeniyle indüklenebilecek testiküler apoptozun incelendiği bir araştırmada, deltametrin (21 gün boyunca günde 1 mg/kg) uygulanan sıçanlarda, malondialdehit (MDA) olarak ölçülen hem NO hem de lipid peroksidlerin plazma seviyelerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuş ve uygulamanın nükleer bölünme indeksini azaltarak sitotoksositeye sebep olduğu da bildirilmiştir (El-Gohary ve ark., 1999). Bu araştırma ve aynı yöntemle karışımın belirlenen lipid

peroksidasyonundaki artış etkisi ile beraber sitotoksik etki tespit edilen çalışmamız da pek çok duyarlı dokuda oksidatif stres potansiyelinin hücre canlılığındaki redüksiyona sebep olabileceğini göstermektedir.

Yousef ve ark., (2006) deltametrinin sıçanlarda oksidatif strese neden olma eğilimini araştırmak için kısa süreli (30 gün) oral maruziyet sonrası biyokimyasal parametreleri değerlendirmişlerdir. Yapılan test sonuçları; deltametrinin plazmada tiyobarbitürik asit-reaktif maddelerinin (TBARS; lipit peroksidasyon markörü) oluşumunu indüklediğini göstermiştir. Yine tek başına deltametrin etkisinin incelendiği araştırmalara örnek teşkil eden bu çalışma ile başka bir grup insektisit bileşiği ile karışım halinde etkisinin incelendiği çalışmamızdan benzer bir yöntemle elde ettiğimiz lipit peroksidasyon verileri birbirini desteklemektedir.

Tüzmen ve ark., (2008) deltametrin ve klorpirifos ile sıçanlarda yaptıkları *in vivo* çalışmada DEL düşük doz (5 mg/kg/gün), DEL yüksek doz (35 mg/kg/gün) ve CP+DEL karışım (1 mg/kg/gün + 1mg/kg/gün) konsantrasyonlarının 16 haftalık uygulamasından sonra karaciğer MDA seviyesi ve SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri belirlenmiştir. Klorpirifos ve deltametrin uygulaması hepatic LPO seviyelerinde bir artış göstermiştir. Araştırmacılar deltametrin ve karışım uygulamasının, oksijensiz radikallerin artmasına neden olabileceğini ve bu durumun GSH-Px aktivitesini stimüle edebileceğini bildirmişlerdir.

Aydın, (2011) *in vitro* çalışmasında deltametrinin, thiaklopridin ve bu insektisitlerin bir kombinasyonunun lenfoid organlar (dalak, timus ve kemik iliği), polimorfonükleer lökositler (PMN'ler) ve sıçan plazması üzerindeki akut ve subakut toksik etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, thiaklopridin'in 112.5 mg/kg'lık tek bir akut dozu; 30 gün boyunca 22.5 mg/kg/ gün'lük bir dozu; deltametrinin 15 mg/kg'lık tek bir akut dozu; subakut dozu (30 gün boyunca 3 mg/kg/gün) ve bunların aynı oranlarda iki kombinasyonlarını içeren altı farklı doz uygulanmıştır. Çalışmada, insektisit dozlarının özellikle de kombine dozların tüm lenfoid organlarda, plazmada ve PMN'lerde TBARS miktarını artırarak lipit peroksidasyonunu indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca lenfoid organlarda, insektisit kombinasyonlarının glutatyon seviyelerini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak insektisitlerin özellikle de karışımlarının oksidatif stres potansiyeli rapor edilmiştir.

Bu model organizmada yapılmış deneylerden elde edilen sonuçlar, çalışmamızda karışım halindeki insektisit insan akciğer fibroblastlarda da GSH ve MDA seviyelerini değiştirerek benzer bir oksidatif etki gösterdiği sonuçlarımızla uyusmaktadır.

Romero ve ark., (2012) deltametrin ve 3 ana metabolitiyle insan nöroblastoma hücre hattında yaptıkları çalışmada, deltametrin ve özellikle iki metabolitinin 10, 100 ve 1000 µM konsantrasyonlarda sitotoksik karakter gösterdiğini MTT indirgenme testiyle, deltametrin ve metaboliti 4-OH deltemetrin'in 10 µM'da dahi lipit peroksidasyonunu artırdıklarını ise MDA miktarı ölçümü ile belirlemişlerdir. Bu durum, aynı yöntemlerin yanı sıra GSH tespiti ile antioksidant azalışı da ölçülen ve insektisit karışımının yine insana ait farklı hücre hattında sitotoksikite ve oksidatif stres potansiyellerinin belirlendiği çalışmamızın verileriyle örtüşmektedir. Ayrıca, önemli bir benzerlikte her iki çalışmada insektisit ana maddelerin ve/veya metabolitlerin etkilerinin araştırılmasıdır ki çalışmamızda kullanılan hücre hattı bunun için karaciğer mikrozom fraksiyonu S9 ile de muamele edilmiştir. Sonuçlar, özellikle 24 saatten daha uzun maruziyet durumunda insektisit karışımının S9 fraksiyonu ile birlikte verildiği gruplarda daha fazla hücre ölümü gerçekleştiğini ve tüm sürelerde sadece insektisit içeren gruplarından daha yüksek oksidatif etki ortaya çıktığını göstermiştir. Zenobiyotiklerin metabolitlerinin ana bileşikler kadar ve bazen daha toksik olabilmektedir. Pek çok çalışmada rapor edildiği üzere insektisitlerin hücrede veya organizmada uğradıkları metabolizma sonucu toksik metabolitler üretmektedir. Söz konusu durum her iki çalışmada da paralellik gösteren ortak bir nokta olup, kullanılan insektisitlerin metabolitlerinin toksik etki potansiyellerine işaret etmektedir.

Şekeroğlu ve ark., (2013) *in vivo* olarak yaptığı çalışmada 24 saat (DEL 15 mg/kg, THIA 112.5 mg/kg, DEL+THIA 15 mg/kg + 112.5 mg/kg) tek doz ve 30 gün (DEL 3 mg/kg, THIA 22.5 mg/kg, DEL+THIA 3 mg/kg + 22.5 mg/kg) tekrarlayan dozlarda deltametrin ve thiakloprid insektisitlerini tek başlarına ve karışım halinde uygulamışlardır. Çalışmada bu insektisitlerin sıçan kemik iliği hücrelerinde, özellikle birlikte olan uygulamalarda mitotik indeksi (MI) istatistiksel olarak önemli derecede düşürdüğünü bildirilmiştir. Sıçan kemik iliğinde insektisit karışımına bağlı olarak proliferasyonun azaldığını gösteren bu veri, çalışmamızda MTT testleri ile elde

edilen hücre canlılığındaki düşüşle paralellik göstermektedir. Elde edilen bu sonuç; çalışma konusunda ele alınan insektisitlerin kullanılan memeli hücresinde sitotoksik potansiyeline işaret etmektedir.

Deltametrin ve florid iyonunun tek başlarına ve kombinasyonu şeklinde sıçanlara muamelesini içeren *in vivo* çalışmada, maddelerin hem tek başlarına hem de karışım halinde karaciğer dokusunda GST seviyelerini düşürdüğü ve MDA oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (Dubey ve ark., 2013). Deltametrinin başka bir etken ile kombine edildiği çalışma örneklerinden birinde ise deltametrinin (1.02, 2.56 ve 6.40 mg/kg) ve diklorvos'un (0.64, 1.64 ve 4.00 mg/kg) 90 gün boyunca sıçanlara verilmiştir (Xu ve ark., 2015). Düşük dozlarda dahi pestisitler tarafından indüklendiği tahmin edilen ve antioksidan enzim aktivitesinde bir azalma ve lipit peroksidasyonunda bir artış ile ortaya çıkan oksidatif hasar ve protein oksidasyonu rapor edilmiştir. Deltametrin etkisinin karışımlar halinde de incelenmiş olması çalışmamızla ortak noktalar ve tek başına gösterdiği oksidatif stres potansiyelden fazla etki belirlenmiş olması başka çalışmalarda da rapor edilen kombine insektisitlerin sinerjetik etkileşimine ışık tutması açısından çalışmamızın önemini vurgulamaktadır. Bu kısmın başında da belirtildiği gibi; bileşiklerin tek başlarına incelendiği çalışmaların yanında kombinasyonlarıyla ilgili çalışma yetersizdir.

Epitel morfolojili insan kemik iliği hücrelerinde 50 ve 250 μM 'lık deltametrin konsantrasyonları 48 saatlik süre uygulanmış ve MTT yöntemi ile test edilmiştir. Yapılan deneyler hücre morfolojisinde değişikliklerin eşlik ettiği deltametrinin dozlarına bağlı şekilde hücre canlılığında önemli düşüşlerle sonuçlanmıştır (Ko ve ark., 2016). Hücre canlılığı kapsamında bizim çalışmamızı destekler nitelikte olan bu sonuçlar mitotok indeksi yüksek bir hücre grubunda yapılmış olup çalışmamızda karışımda kullanılması sebebiyle daha yüksek deltametrinin dozları ile elde edilmiştir.

2016 yılında deltametrinin toksisitesinin erken tanısı ve karaciğer toksisitesi göstergeleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği *in vivo* bir çalışma yayınlanmıştır (Çavuşoğlu ve ark., 2016). Araştırmada, gavaj yoluyla oral olarak deltametrin uygulanmış sıçan gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, muamele dozu arttıkça malondialdehid düzeylerinin arttığı, glutatyon düzeylerinin ise azaldığı rapor

edilmiştir. Yine Ncir ve ark., (2017)'de yaptığı bir başka in vivo çalışmada deltametrin dozunu 7.2 mg/kg olarak belirlemiş ve 4 hafta boyunca uygulama sonucunda deltametrinin lipit peroksidasyon (LPO) seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla artmasına neden olduğu gösterilmiştir. In vivo çalışmalar olsa da bu iki çalışmada, aynı parametrelerin incelenmiş olması ve benzer sonuçlar elde edilmiş olması sebebiyle, bizim sonuçlarımızla paralellik gösterdiği ve birbirini desteklediği söylenebilir. Çalışmamızda karışım etkisinin incelenmesi ve verilerimiz ile benzerlik gösteren başka bir çalışma da Chargui ve ark.'nın (2010) yaptığı çalışmadır. Ratlarda enzimatik antioksidant sistemin incelendiği bu çalışmada deltametrin ve aynı gruptan permetrin karışımının özellikle dişi bireylerde ve 30 ile 60 günlük uygulamalarda en az tek başlarına gösterdikleri kadar veya daha fazla etki tespit edilmiştir. Karışımın süperoksit dismutaz enzim inhibisyonuna ve glutatyon peroksidaz enzim seviyelerinde düşüşe sebep olduğu bildirilmiştir.

Yine son yıllarda da deltametrin toksisitesini inceleyen veya bu toksisiteyi iyileştirici mekanizmaları veya koruyucu etkileri araştıran yayınlar mevcuttur. Bunlardan biri Kumar ve ark.'nın (2018) deltametrinin lenfoid hücreler üzerindeki toksisitesini farelerde araştırdığı çalışmadır. Uygulanan tek bir DEL dozu (5 mg/kg, yedi gün boyunca, oral) ile sitotoksosite (MTT testi) ve oksidatif stres göstergeleri incelenmiştir. DEL ile muamele edilmiş farelerde vücut ağırlığının, hücresel kabiliyetin ve hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Dalak ve timustaki ROS indüksiyonu ve GSH seviyelerindeki belirgin azalış, çalışmamızda da karışım etkisi ile belirlenen deltametrin kaynaklı oksidatif stresi göstermektedir.

Koruyucu etkinin araştırıldığı çalışmalara bir örnek ise, Mekircha ve ark.'nın (2018) zeytin yağının, sıçanlarda deltametrin tarafından indüklenen oksidatif strese ve hipofiz, tiroid ve gonadal hormon değişikliklerine karşı koruyucu bir etki yapıp yapmadığını araştırmayı amaçlayan çalışmadır. Sıçanlara 28 gün boyunca uygulanan DEL (0,00256 g/kg vücut ağırlığı) dozu ile yapılan bu çalışmada bizim çalışmamızın sonuçlarında da görüldüğü üzere GSH seviyesinde azalmalar rapor edilmiştir. Bu veriler deltametrinin tek başına veya karışım halinde oksidatif strese ve endokrin değişikliklere sebep olabilen bir ajan olduğu belirlenmiştir.

DEL'in sitotoksitesini ve oksidatif stres meydana getirdiğini gösteren yeterli sayıda çalışma bulunmaktadır. Buna karşın yeni nesil bir insektisit olan THIA ile ilgili oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak, literatür bilgilerinden de görülebileceği gibi, son zamanlara kadar DEL ve THIA insektisitlerinin karışım halinde kullanıldığında ortaya çıkabilecek toksik etkinin incelendiği sadece bir *in vivo* çalışma bulunmaktadır.

Thiaklopid ile ilgili veriler, genellikle bu maddeyi içeren insektisitleri piyasaya sunan firma ve Çevre Koruma Ajansı'nın yayınlanmamış raporlarından öğrenilmektedir (EPA, 2005; WHO 2016 ve FAO 2010; Herbold, 1995a; Herbold, 1995b; Brendler-Schwaab, 1996a; Brendler-Schwaab, 1996b). Yakın zamanda artan ilgi ile sitotoksik ve genotoksik potansiyeli konusunda da bilim dünyasında farklı görüşler ortaya konan çalışmalar artış göstermektedir. Örneğin, yukarıda tartışılan adı geçen insektisitlerin karışımlarına ait etkilerin araştırıldığı tek *in vivo* çalışmada (Şekeroğlu ve ark., 2013) belirtildiği gibi thiaklopidin tek başına uygulanması pozitif kontrol ve karışım kadar olmasa da mitotik indeksi düşürmüştür. Benzer olarak Osterauer ve ark., (2007) zebra balığında embriyonik gelişimi üzerine, içerisinde thiaklopidinde bulunduğu insektisit karışımının etkilerini incelemiştir. Araştırmacılar thiaklopid'in düşük toksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Thiaklopidin tek başına düşük etkisine işaret eden bu araştırmaların yanında tek başına thiaklopid toksik potansiyelini gösteren *in vivo* çalışmalardan da örnekler sunabiliriz.

Calderón-Segura ve ark., (2012)'nin neonikotinoit grubu bazı insektisitlerin insan periferik lenfositlerinde etkisini inceledikleri çalışma az sayıda örnekten biridir. Araştırmacılar bu çalışmada, 60-140 mM arası thiaklopid dozları iki saatlik süre ile insan periferik lenfositlerine uygulandığında, en yüksek iki dozda anlamlı derecede hücre ölümü gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, bizim daha düşük doz ama uzun uygulama sürelerinde belirlediğimiz thiaklopid içeren karışımın sitotoksik etkisi ile paralellik göstermektedir. *In vitro* çalışmamızda çok daha düşük dozlarda thiaklopid kullanılmasına rağmen karışım halinde kullanılması sebebiyle bir sinerjetik etki gözlenmiş olabilir. Ayrıca kullanılan S9 fraksiyonunda karışımın metabolitlerinin etkisini de açığa çıkarmış olabileceği unutulmamalıdır.

Bir diğerk örnek çalışma ise Drážíovská ve ark., (2013) tarafından thiaklopid'in ticari formúlasyonu ile yapıldığı çalışmadır. Bu çalışmada sığır periferik lenfositleri kullanılmış olup 30-480 µg/ml arasında çeşitli thiaklopid dozları 24 ve 48 saat süre ile test edilmiştir. Her iki zaman noktasında özellikle yüksek dozlarda, proliferasyon indeksinde (PI) önemli düşüşler bildirilmiştir. Benzer bir şekilde çalışmamızda da karışım dozlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarında yüksek dozlarında MTT testi ile azalmış hücre canlılığı tespit edilmiştir. 72 saatlik uygulamada ise daha düşük dozlarda daha yüksek sitotoksikite ortaya çıkmıştır.

Kocaman ve ark., (2014) thiaklopidin insan periferik kan lenfositleri üzerindeki potansiyel genotoksik etkilerini, *in vitro* olarak kromozom anormallikleri (CA), kardeş kromatid değişimleri (SCE) ve mikronükleus (MN) analizleri ile araştırmışlardır. İnsan periferik lenfositlerinin, eksojen bir metabolik aktivatörün (S9 karışımı) yokluğunda ve varlığında 75, 150 ve 300 µg/mL thiaklopid insektisitine maruz bırakıldığı çalışmada, hem S9 karışımının yokluğunda hem de varlığında tüm konsantrasyonlarda mitotik indeksi, proliferasyon indeksini ve nükleer bölünme indeksini önemli ölçüde azaltmıştır. Konsantrasyona bağlı bir değişim gözlenmemiş olsa da S9 varlığında mitotik indeks pozitif kontrol kadar düşmüştür, PI'nde ise S9 varlığında konsantrasyona bağlı ve pozitif kontrol kadar düşüş belirlenmiştir. Bölünme indekslerindeki bu değişim, hem thiaklopidin toksik potansiyelini hem de metabolik aktivatör varlığında konsantrasyona bağlı ve pozitif olarak kullanılan siklofosamid ve mitomisin-c kadar etkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki insektisit karışımının metabolizması sonucu görülen etkiyi açık bir şekilde destekler niteliktedir.

6 ve 8 aylık iki boğa dönuru ile yaptığı *in vivo* çalışmada thiaklopid insektisiti 30, 60, 120, 240, 480 µg/mL şeklinde 24 ve 48 saat uygulamıştır. Çalışmada, thiaklopid'in 24 ve 48 saatlerde sırasıyla 480 ile 240 ve 480 µg/mL'lik konsantrasyonlarda mitotik indeksi anlamlı derecede düşürdüğü belirlenmiştir. PI'ni ise 24 saatte yine en yüksek dozda etki gösterirken 48 saatlik uygulamada ise yüksek üç dozda pozitif kontrol kadar düşürmüştür. Ayrıca enzimatik antioksidant üzerine etkisi glutatyon-S-transferaz gen ekspresyonu tespiti ile gerçekleştirilmiştir. Test sonucu düşük dozda gen ekspresyonunda azalış görölürken, yüksek dozlarda mRNA ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Antioksidant enzim üretimindeki artışın pestisit

kaynaklı oksidatif stresin indüklenmesine cevap olarak gerçekleşmiş olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Galdikova ve ark., 2015). Çalışmamızda non-enzimatik mekanizmanın elemanı olan glutatyon değerinde azalmalar ölçülmüş olup insektisit karışımının muhtemelen benzer şekilde indüklediği oksidatif strese cevap olarak azalması beklenen bir durumdur. Ayrıca iki çalışmadan elde edilen indirekt hücre bölünme ve canlılık parametreleri de insektisit karışımının benzer sitotoksik potansiyeline işaret etmektedir.

Hendawi ve ark., (2016)'nın thiaklopid toksisitesine bağlı hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri ve keten tohumu yağının erkek Wistar albino sıçanlarındaki potansiyel koruyucu rolünü değerlendirmek için yaptıkları *in vivo* çalışmada, glutatyon-S-transferazda belirgin bir azalma görülürken, lipit peroksidasyon (MDA) önemli ölçüde artmıştır. Farklı deneysel tasarımlarda ve benzer ya da farklı yöntemlerle yapılmış bu ve benzeri oksidatif çalışmalar *in vivo* model ve hedef olmayan organizmalarda ve *in vitro* memeli hücrelerinde hem thiaklopid ve deltametrin hem de başka insektisitlerin ve onların karışımlarının potansiyel ajanlar olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada, deltametrin ve thiaklopid karışım konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamasında çözücü kontrollere göre hücre canlılığının önemli derecede azalması ve sitotoksitenin önemli derecede artması, bu karışımın hTERT WHTBF-6 insan akciğer fibroblast hücrelerinde sitotoksik olabileceğini göstermektedir. Ayrıca deltametrin ve thiaklopid karışım konsantrasyonunun 24, 48 ve 72 saatlik uygulamasında çözücü kontrollere göre GSH düzeyinin önemli derecede azalması ve MDA düzeyinin önemli derecede artması, bu karışımın hTERT WHTBF-6 insan akciğer fibroblast hücrelerinde oksidatif stres olabileceğini göstermektedir. Deltametrin ve thiaklopid ile ilgili olarak yapılan bazı çalışmalarda da araştırmacılar tarafından benzer sonuçların gösterilmesi, bu düşüncemizi desteklemektedir.

Bununla birlikte, henüz yeterince toksisite testleri yapılmamış olan pestisitlerin, bu eksikliklerinin ulusal ve uluslararası otoriteler tarafından giderilmesi ve insanlar için güvenli olanların belirli dozlarda kullanımına izin verilmesi gerekmektedir. Pestisitlerin kullanımlarının riskli olabileceğini öne süren bu tip çalışmalar, gerekli önlemlerin alınması için örnek teşkil edecek, doğal dengenin korunmasına vurgu yaparak, biyolojik ve tıbbi uygulamalara katkıda bulunacak ve böylece insan sağlığını tehdit eden ciddi hastalıklarından korunma sağlanacaktır.

Deltametrin ve thiaklopid insektisitleri, thiaklopid deltametrinin 7,5 katı olacak şekilde ticari bir üründe (150 g/l thiaklopid + 20 g/l deltametrin) karışım halinde de piyasaya sürülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda test ettiğimiz insektisitlerin karışım halindeki genotoksik etkileri de belirlenmiştir. Çalışmamızda insektisitlerin karışım halindeki etkisi belirlenirken thiaklopid dozu, bu oran dikkate alınarak deltametrinin 7,5 katı olarak ayarlanmıştır.

Çalışmamızda DEL+THIA karışımının doza bağlı olarak hTERT WHTBF-6 hücrelerinde GSH miktarında belirgin olarak azalmaya sebep olması, bu insektisit hücrelerde oksidatif strese neden olduğu anlamına gelmektedir. Çok önemli bir antioksidan molekül olan GSH'daki azalma 72. saat sonrasında da devam etmiş ve S9'lu ve S9'suz 25+375 µM karışım konsantrasyonunda en dramatik düşüş göstermiştir. Benzer şekilde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda lipit

peroksidasyonunun arttığı görülmüştür. Genel olarak değerlendirilen bu sonuçlar DEL+THIA karışım konsantrasyonunun hTERT WHTBF-6 hücrelerinde doz artışa bağlı olarak oksidatif hasar meydana getirdiğini göstermektedir. Literatürde deltametrin, thiaklopid ve benzeri insektisitlerle ayrı ayrı ya da karışım halinde yapılmış *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmasına rağmen, çalışmamız DEL+THIA karışım konsantrasyonunun hTERT WHTBF-6 hücrelerinde oksidatif hasar yaptığını gösteren ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Her ne kadar bizim sonuçlarımız ve daha önceden yapılan az sayıda çalışma deltametrin ve thiaklopid insektisitinin hücre canlılığını azalttığı ve oksidatif strese yol açtığını gösteriyor olsa da, bu insektisitlerin sitotoksisite ve genotoksisitesi hakkında kesin bir yargıya varabilmesi, etki mekanizmalarının ve bu mekanizmalar arasındaki ilişkileri belirlenebilmesi ve bu insektisitlerin kullanımı ile ilgili düzenlemelerin yapılabilmesi için, farklı hücre hatlarının ve farklı yöntemlerin kullanıldığı daha detaylı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarından elde edilen verilerin yayımlanması ve bilim dünyasına sunulması sayesinde, hem üniversitemiz ve ülkemiz bazında hem de dünya genelinde bilimin gelişimine büyük katkı sağlanacaktır. Bu tip çalışmalar ile insan sağlığı dikkate alındığında ve toplumda yüksek oranda kanser hastası olduğu düşünüldüğünde, bu insektisite bağlı tümör oluşumunun önlenmesine ve koruma stratejilerinin üretilmesine katkıda bulunabilecektir. Bunun yanında bu çalışmalar, ilgili birimlerin tarım ilacı üretimi ve kullanımı ile ilgili düzenlemelere yön verebilecek ve gerekirse harekete geçirebilecektir. Dünya genelinde pestisit kullanımının ve kanser vakalarının gittikçe artış gösterdiği düşünülürse yapılan bu tip araştırmalar insan sağlığına büyük katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKÇA

- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emami, B., Fooladian, F., & Zafari, K. (2003). Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(3), 331-336.
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.
- Alavanja, M.C.R., Ross, M.K., & Bonner, M.R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 63(2):120-42.
- Aldridge, W.N. (1990). An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 21, 89-104.
- Anwar, W.A. (1997). Biomarkers of human exposure to pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 105(Suppl 4):801-6.
- APVMA, (2001). Evaluation of the new active Thiakloprid in the new product Calypso 480 SC insecticide. Canberra, Australia.
- Aydin, B. (2011). Effects of thiakloprid, deltametrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 165-171.
- Baeza-Squiban, A., Marano, F., Ronot, X., Adolphe, M., & Puisieux-Dao, S. (1987). Effects of deltametrin and its commercial formulation DECIS on different cell types *in vitro*: Cytotoxicity, cellular binding, and intracellular localization. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28(1), 103-113.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., & Stohs S.J. (1995). *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 129-140.
- Banerjee, B.D., Seth, V., & Ahmed, R.S. (2001). Pesticide-induced oxidative stress: Perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*, 16, 1-40.
- Barlow, S.M., Sullivan, F.M. & Lines, J. (2001). Risk assessment of the use of deltametrin on bednets for the prevention of malaria. *Food Chemical Toxicology*, 39, 407- 422.
- Bhunya, S.P., & Pati, P.C. (1990). Effect of deltametrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis*, 5(3), 229-232,
- Blair, I. A. (2001). Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experimental Gerontology*, 36: 1473.
- Bradberry, S. M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T., & Vale, J.A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24, 93-106.
- Brash, A. R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 23679, 90.

- Brendler-Schwaab, S. (1996a). YRC 2894-mutagenicity study for the detection of induced forward mutations in the V79/HPRT assay *in vitro*. Unpublished report No. 25163, edition No. M-000799-01-1, Bayer AG, Wuppertal, Germany.
- Brendler-Schwaab, S. (1996b). YRC 2894-test on unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures *in vitro*. Unpublished report No. 25429, edition No. M-000790-01-1, Bayer AG, Wuppertal, Germany.
- Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. del C., & Bañuelos-Ruiz, E. (2012). Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed *In vitro* to Neonicotinoid Insecticides News. *J Toxicol.*, 612647.
- Cavusoglu T, Aydin MF, Cagiltay E, Yigitturk G, Kiziloglu I, Meral A, Kilic KD, Uyanikgil Y, Cetin Uyanikgil EO, Erbas O. The effects of subacute deltamethrin exposure on rat liver: histochemical, immunohistochemical, and biochemical study. *FNG & Bilim Tip Dergisi* 2016;2(2):130-137.
- Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., Castro, JD., Espinosa, E., Redondo, A., Sereno, M., Garcia-Cabezas, M.A., Vara, J.A.F., Dominguez-Caceres, A., Perona, R. & Gonzalez-Baron, M. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes and Control*, 15: 707–719.
- Chargui I, Falcioni M.L, Cheikh HB, & Gabbianelli R. (2010). Erythrocyte antioxidants enzymes imbalance following subcutaneous pyrethroid treatments in rats of different sex. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, 116-120.
- Chargui, I., Grissa, I., Bensassi, F., Hrira, M.Y., Haouem, S., Haouas, Z., & Bencheikh, H. (2012). Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): a molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(6), 672-683.
- Chinn, K., & Narahashi, T. (1986). Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of Physiology*, 380(1), 191-207.
- Cole, L.M., Ruzo, L.O., Wood, E.J., & Casida, J.E. (1982). Pyrethroid metabolism: comparative fate in rats of tralomethrin, traloccythrin, deltamethrin, and (1R, alpha S)-cis-cypermethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 631–636.
- Çakır, Ş., & Yamanel, Ş., (2005). Böceklerde insektisitlere direnç. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi*, 6 (1), 21-29.
- Demsia, G., Vlastos, D., Goumenou, M., & Matthopoulos, D.P. (2007). Assessment of the genotoxicity of Imidacloprid and Metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutation Research*, 634 (1–2), 32-39.

- Dich, J., Zahm, S.H, Hanberg, A., & Adami H.O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes Control*, 3:420–43.
- Dowla, H.A., Panemangalore, M., & Byers, M.E., (1996). Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma *in vitro* by agricultural chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31, 107–114.
- Drážovská, M., Šiviková, K., Dianovský, J., Holečková, B., & Galdíková, M. (2013). Use of sister chromatid exchanges and comet assay in genetic risk assessment. *Animal Welfare, Ethology and Housing Systems*, Vol.9 No.3, Suppl. 2; 427-432.
- Dubey N, Khan AM, Raina R (2013) Sub-acute deltamethrin and fluoride toxicity induced hepatic oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 91:334–338.
- ECB, (2008). Assessment report Thiaklopid product-type 8. directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. Annex I, UK.
- Elbert, A., Buchholz, A., Ebbinghaus-Kintscher, U., Erdelen, C., Nauen, R., & Schnorbach, H.J. (2001). The biological profile of thiaklopid A new chloronicotinyl insecticide. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (English edition)* 54:185–208.
- Elbert, A., Erdelen, C., Hattori, Y., Kühnhold, J., Nauen, R., & Schmidt, H.W. (2000). Thiaklopid: A novel Neonicotinoit insecticide for foliar application. Proceedings of the British Crop Prot Conference Pests and Diseases, BCPC, Farnham, Surrey, UK. pp. 21–26.
- El-Gohary, M., Awara, W. M., Nassar, S., & Hawas, S. (1999). Deltametrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*. 132 (1), 1-8.
- Emden, H.F., & Peakall, D.B. (1996). Beyond silent spring: integrated pest management and chemical safety.
- EPA, (2003). Office of prevention, pesticides and toxic substances (7501C).
- EPA, (2005). Summary Of Toxicology Data Thiaklopid. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/pdfs/5888.pdf>. (Erişim tarihi: 10 Aralık 2014).
- Erdelen, C. (2001). Field trials with Calypso (thiaklopid) in fruit cultivation in Germany. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer (English edition)* 54:291–306.
- FAO, (2010). Fao Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides, Thiaklopid. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Thiaklopid_2010.pdf. (Erişim tarihi: 13 Ağustos 2018).
- Forshaw, P.J., & Bradbury, J.E. (1983). Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. *European Journal of Pharmacology*, 91(2), 207-213.
- Galaris, D., Skiada, V., & Barbouti, V. (2008). Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron. *Cancer Letters*, 266, 21-29.

- Galdíková, M., Šivíková, K., Holečková, B., Dianovský, J., Drážovská, M., & Schwarzbacherová, V. (2015). The effect of thiaklopid formulation on DNA/chromosome damage and changes in GST activity in bovine peripheral lymphocytes. *Journal of Environmental Science and Health-Part B*, 50(10), 698-707.
- Gassner, B., Wüthrich, A., Lis, J., Scholtysik, G., & Solioz, M. (1997). Topical application of synthetic pyrethroids to cattle as a source of persistent environmental contamination. *Journal of Environmental Science & Health-Part B*, 32(5), 729-739.
- Giray, B., Gürbay, A., & Hincal, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters*, 118, 139-46.
- Gold, L.S., Sterna, B.R., Slone, T.H., Brown, J.P., Manley, N.N., & Ames, B.N. (1997). Pesticide residues in food: investigation of disparities in cancer risk estimates. *Cancer Letters*, 117, 195-207.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280, 1–8.
- Hamberg, M. (1998). Stereochemistry of oxygenation of linoleic acid catalyzed by prostaglandin-endoperoxide H synthase-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 349-376.
- He, F., Deng, H., Ji, X., Zhang, Z., Sung, J., & Yao, P. (1991). Changes of nerve excitability and urinary deltamethrin in sprayers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 62(8), 587-590.
- Hendawi, M.Y., Alam, R.T.M., & Abdellatif, S. A. (2016). Ameliorative effect of flaxseed oil against thiaklopid-induced toxicity in rats: hematological, biochemical, and histopathological study. *Environmental Science Pollution Research*, 23:11855-11863.
- Herbold, B. (1995a). YRC 2894– *In vitro* mammalian chromosome aberration test with chinese hamster V79 cells, Unpublished report No. 24516, edition No. M-000772-01-1, Bayer AG, Germany.
- Herbold, B. (1995b). YRC 2894– Micronucleus test on the Mouse, Unpublished report No. 24515, edition No. M-000775-01-1, Bayer AG, Germany.
- Hisada, R., & Yagi, T. (1977). 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate. A photochemically stable electron mediator between NADH and various electron acceptors. *Journal of Biochemistry*, 82, 1469-1473.
- Hoellinger, H., Lecorsier, A., Sonnier, M., Leger, C., Do-cao-thang, & Nguyen-hoang-nam. (1987). Cytotoxicity, Cytogenotoxicity and Allergenicity Tests on Certain Pyrethroids. *Drug and Chemical Toxicology*, 10(3-4), 291-310.
- Husain, R., Malaviya, M., Seth, P. K., & Husain, R. (1994). Effect of Deltamethrin on Regional Brain Polyamines and Behaviour in Young Rats. *Pharmacology & Toxicology*, 74(6), 211-215.
- IARC (International Agency for Research on Cancer Working Group). (1991). Occupational exposures in spraying and application of insecticides. IARC

Monographs Programme on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 53:45–92.

- IPCS (International Programme on Chemical Safety). (1990). Environmental Health Criteria 97, Deltametrin. World Health Organization, Geneva.
- Issam, C., Samir, H., Zohra, H., Monia, Z., & Hassen, B.C. (2009). Toxic responses to deltamethrin (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(6), 663-670.
- IUPAC (2006). "Glossary of Terms Relating to Pesticides"(PDF). IUPAC. p. 2123. Son erişim tarihi: 13 Ağustos 2018.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of Neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.
- Janakara, B. R. et al. (1995). Deltamethrin impregnated bednets against *Anopheles minimus* transmitted malaria in Asam, India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 73-83.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2897–2908.
- John, S., Kale, M., Rathore, N., & Bhatnagar, D. (2001). Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 500–504.
- Kavlock, R., Chernoff, N., Baron, R., Linder, R., Rogers, E., Carver, B., Simmon, V. (1979). Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 2(3), 751-765.
- Kaya, E., (2005). Klorprifos ve Deltametrinin kan ve beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 69 s.
- Ko, J., Park, J.H., Park, Y.S., & Koh, H.C. (2016). PPAR- γ activation attenuates deltamethrin-induced apoptosis by regulating cytosolic PINK1 and inhibiting mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 260, 8-17.
- Kocaman, A.Y., Rencüzoğulları, E., & Topaktaş, M. (2014). *In vitro* investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiakloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 29(6), 631-641.
- Kollmeyer, W.D., Flattum, R.F., Foster, J.P., Powell, J.E., Schroeder, M.E. & Soloway, S.B. (1999). Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* (eds I. Yamamoto & J. Casida), pp. 71–89. Springer-Verlag, Tokyo.
- Kovganko, N.V., & Kashkan, Zh.N. (2004). Advances in the synthesis of Neonicotinoids. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 40(12), 1709-1726.

- Kumar A, Sasmal D, & Sharma N. (2015). An Insight into Deltametrin Induced Apoptotic Calcium, p53 and Oxidative Stress Signalling Pathways. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 7(1), 25-34.
- Lapenna, D., & Cuccurullo, F. (1993). TBA test and "free" MDA assay in evaluation of lipid peroxidation and oxidative stress in tissue systems. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 265(3), 1030-1032.
- Lawrence, L.J., & Casida, J.E., (1982). Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure-toxicity relationships. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 9–14.
- Lee, S.H., & Blair, I.A. (2000). Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 13: 698.
- Lee, C.H., Kamijima, M., Kim, H., Shibata, E., Ueyama, J., Suzuki, T., Takagi, K., Saito, I., Gotoh, M., Hibi, H., Naito, H., & Nakajima, T., (2006). 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocyte and urine according to exposure to organophosphorus pesticides and paraoxonase 1 genotype. *International Archives of Occupational Environmental Health* (Epub ahead of print).
- Li, P., Ann, J., & Akk, G. (2011). Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the Neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *Journal of Neuroscience Research*, 89:1295–1301.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Bernardino, D., & Ursini, M.V. (1998). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research*, 403, 13-20.
- Longnecker, M.P., Rogan, W.J., & Lucier, G. (1997). The human health effects of DDT (dichlorophenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annual Review of Public Health*, 18:211–44.
- Lovász, M.E, & Zeic, A. (2013). Respiratory status related to pesticides exposure in a rural area of transylvania. *Aerul și Apa: Componente ale Mediului*, 508-515.
- Lukowicz-Ratajczak, J., & Krechniak, J. (1992). Effects of deltametrin on the immune system in mice. *Environmental Research*, 59(2), 467-475.
- Mage, D.T., Allen, R.H., Gondy, G., Smith, W., Barr, D.B., & Needham, L.L. (2004). Estimating pesticide dose from urinary pesticide concentration data by creatinine correction in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-III). *Journal of Exposure Analysis Environmental Epidemiology*, 14, 457–465.
- Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, & Widmer, H. (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation Neonicotinoid. *Pest Management Science*, 57(10), 906-913.


- Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 83-95.
- Mekircha, F., Chebab, S., Gabbianelli, R., & Leghouchi, E. (2018). The possible ameliorative effect of *Olea europaea* (L.) oil against deltamethrin-induced oxidative stress and alterations of serum concentrations of thyroid and reproductive hormones in adult female rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11(161):374–382.
- Merrick, B.A. (2006). Toxicoproteomics in liver injury and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076:707–17.
- Michelangeli, F., Robson, M. J., East, J. M., & Lee, A. G. (1990). The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1028(1), 49-57.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268, 157–177.
- Muccio, A.D., Pelosi, P. & Barbini, D.A. (1997). Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion. *Journal of Chromatography A*, 765, 51- 60
- Mullins, J.W. (1993). Imidacloprid: A New Nitroguanidine Insecticide. American Chemical Society Symposium Series, 524, 183-198.
- Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V., & Kisby, G.E. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227, 97-107.
- Myers, M.A. (1998). Direct measurement of cell numbers in microtitre plate cultures using the fluorescent dye SYBR green I. *Journal of Immunological Methods*, 212(1), 99-103.
- Nakamura, S., Arimura, K., Ogawa, K., & Yagi, T. (1980). Use of 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (1-methoxyPMS) in the assay of some enzymes of diagnostic importance. *Clinica Chimica Acta*, 101(2-3), 321-6.
- Narahashi, T. (1991). Transmitter-activated ion channels as the target of chemical agents. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 287, 61–73.
- Nasuti, C., Gabbianelli, R., Falcioni, M.L., Di Stefano, A., Sozio, P., & Cantalamessa, F. (2007). Dopaminergic system modulation, behavioral changes, and oxidative stress after neonatal administration of pyrethroids. *Toxicology*, 229, 194–205.
- Nauen, R. (1995). Behaviour Modifying Effects of Low Systemic Concentrations of Imidacloprid on *Myzus persicae* with Special Reference to An Antifeeding Response. *Pesticide Science*, 44(2), 145-153.
- Ncir, M., Ben Salah, G., Kamoun, H., Makni Ayadi, F., Khabir, A., El Feki, A., & Saoudi, M. (2015). Histopathological, oxidative damage, biochemical, and

- genotoxicity alterations in hepatic rats exposed to deltamethrin: modulatory effects of garlic (*Allium sativum*). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 17, pp. 1-8.
- Newman, L.S., & Gottschall, E.B. (2004). Toxic Inhalational Lung Injury. In: Albert RK, Spiro SG, Jett JR, editors. *Clinical Respiratory Medicine*, 2nd ed.
- Ntzani, E.E., Chondrogiorgi, M., Ntritsos, G., Evangelou, E., & Tzoulaki, I. (2013). Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. EFSA supporting publication, EN-497.
- Osterauer, R., & Köhler, H.R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiakloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 86, 485-494.
- Panemangalore, M., Dowla, H.A., & Byers, M.E., (1999). Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 72, 84-88.
- Power, L.E., & Sudakin, D.L., (2007). Pyrethrin and pyrethroid exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers. *Journal of Medical Toxicology*, 3, 94-99.
- Prasanthi, K., Muralidhara, & Rajini, P.S., (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 299-306.
- Qiao, D., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. (2005). Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206:17-26.
- Ray, A., Banerjee, B.D., Koner, B.C., & Sen, P. (1997). Influence of *Azardirachta indica* (Neem) leaf extract on the immunotoxicity of stress and xenobiotics in experimental animals. *Indian Journal of Pharmacology*, 29: 38-39.
- Romero, A., Ramos, E., Castellano, V., Martínez, M. A., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larranaga, M., & Anadón, A. (2012). Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology in vitro*, 26(6), 823-830.
- Saygi, Ş. (2003). Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45, 291-298.
- Shafer, T.J., Meyer, D.A., & Crofton, K.M., (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*, 113 (2), 123-136.
- Singh, M., Sandhir, R., & Kiran, R., (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 580-583.
- Soderlund, D.M., & Bloomquist, JR. (1989). Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 77-96.

- Soltaninejad, K., & Abdollahi, M. (2009). Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. *Medical Science Monitor*, 15(3), RA75-90.
- Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z.A., & Kefelioğlu, H. (2011). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltametrin and/or thiakloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox.20746.
- Şekeroğlu, V. (2010). Thiakloprid ve Deltametrin İsektisitlerinin Tek Başlarına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman Sıçan Kemik İliği Hücrelerinde *İn vivo* (Rattus Norvegicus Berkenhout, 1769) Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 148 s.
- Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z. A., & Kefelioğlu, H. (2013). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltametrin and/or thiakloprid on wistar rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 28(9), 524-531.
- Thapar, A., Sandhir, R., Kiran, R., (2002). Acephate induced oxidative damage in erythrocytes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 963–996.
- Tomizawa, M., & Casida, J.E. (2003). Selective Toxicity of Neonicotinoits Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 339-364.
- Tomizawa, M., & Casida, J.E. (2005). NEONICOTINOİT INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247-268.
- Tomizawa, M., Cowan, A., & Casida, J.E. (2001). Analgesic and Toxic Effects of Neonicotinoit Insecticides in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177(1), 77-83.
- Tuzmen, N., Candan, N., Kaya, E., & Demiryas, N. (2008). Biochemical effects of chlorpyrifos and deltametrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochemistry & Function*, 26, 119-124.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2004). Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch. Chemicals evaluated for carcinogenic potential.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., Alaoui, H., Belzunces, L.P. & Delbac, F. (2011). Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiakloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by Nosema ceranae. *PLOS ONE*, 6(6), e21550.
- Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35: 95,89.
- Wetmore, B.A., & Merrick, B.A. (2004). Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicologic Pathology*, 6: 619–42.
- WHO (World Health Organization) (2016). www.who.int/topics/pesticides/en/. Son Erişim Tarihi: 13 Haziran 2018.

- Xu, M.Y., Wang, P., Sun, Y.J., Wang, H.P., Liang, Y.J., Zhu, L., Wu, & Y.J. (2015). Redox status in liver of rats following subchronic exposure to the combination of low dose dichlorvos and deltamethrin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124, 60-65.
- Yousef, M.I., Awad T.I, & Mohamed, E.H. (2006). Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*. 227, 240-247.
- Zhang, A., Kaiser, H., Maienfisch, P., & Casida, J.E. (2000). Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor: Conserved Neonicotinoid Specificity of [3H] Imidacloprid Binding Site. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1294-1303.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	ALPEREN KARABIYIK
Doğum Yeri	ŞİŞLİ / İSTANBUL
Doğum Tarihi	25.02.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0506 103 22 30
E-Posta Adresi	alperwnkarabiyik@gmail.com
	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	19.07.2014
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.