T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DELTAMETRİN VE ASETAMİPRİDİN THLE-2 VE HEPG2 HÜCRE HATLARININ ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

CANSU AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR
2023

T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DELTAMETRİN VE ASETAMİPRİDİN THLE-2 VE HEPG2 HÜCRE HATLARININ ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

CANSU AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

I.DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU

II.DANIŞMAN
Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN

KIRŞEHİR
2023

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 29/09/2023

CANSU AYDIN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

İÇİNDEKİLER DİZİNİ ……. I

TEŞEKKÜR …… V

ÖZET …… VI

ABSTRACT …… VII

TABLOLAR DİZİNİ …… VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ …… IX

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ…… XI

1. GİRİŞ ……. 1

1.1. Pestisitler ……... 1

1.1.1. Pestisitlerin Yapısı …… 2

1.1.2. Pestisitlerin Vücuda Alınma Yolları ……... 2

1.1.2.1.Göz Temasıyla …….. 2

1.1.2.2. Ağız Temasıyla …… 3

1.1.2.3. Solunum ile …….. 3

1.1.2.4. Deri Temasıyla ……. 3

1.1.3. Pestisitlerin Çevre ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri …….. 3

1.1.3.1. Pestisitlerin Çevre Üzerine Etkisi …… 3

1.1.3.2. Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri …….. 4

1.1.4. Pestisitlerin Kullanım Amaçları ve Kullanım Oranları …….. 5

1.1.5. Pestisitlerin Sınıflandırılması ……. 8

1.1.6. Pestisitlerin Genotoksik Etkileri ……. 9

1.2. İnsektisitler …… 9

1.2.1. Piretroid Grubu İnsektisitler …….. 10

1.2.1.1. Genel Özellikleri …….. 10

1.2.1.2. Piretroidlerin Toksik Etki Mekanizmaları ……..…… 11

1.2.1.3. Piretroidlerin Biyolojik Metabolizması …… 12

1.2.1.4. Deltametrinin Genel Özellikleri …….. 12

1.2.1.5. Deltametrinin Vücutta Emilimi ve Metabolizması …….. 13

1.2.1.6. Deltametrinin Akut Toksik Etkileri ……..… 14

1.2.1.7. Deltametrinin İnsanlardaki Toksik Etkileri …… 15

1.2.1.8. Deltametrinin Genotoksik Etkileri ……... 16

1.2.1.9. Deltametrinin Hepatoksisite Mekanizması …….. 16

1.2.2. Neonikotinoid Grubu İnsektisitler …….. 17

1.2.2.1. Genel Özellikleri …….. 17

1.2.2.2. Neonikotinoidlerin Toksik Etki Mekanizmaları ……..... 17

1.2.2.3. Neonikotinoidlerin Biyolojik Metabolizması …….. 18

1.2.2.4. Asetamipridin Genel Özellikleri …….. 18

1.2.2.5. Asetamipridin Vücutta Emilimi ve Metabolizması …….. 19

1.2.2.6. Asetamipridin Akut Toksik Etkileri ……. 19

1.2.2.7. Asetamipridin İnsanlardaki Toksik Etkileri ……. 20

1.2.2.8. Asetamipridin Genotoksik Etkileri …….. 20

1.3. Oksidatif Stres Ajanları …… 21

1.3.1. Serbest Radikaller ……... 21

1.3.1.1. Kovalent Bağların Bölünmesiyle Oluşan Serbest Radikaller……... 21

1.3.1.2. Molekülün Elektron Kaybetmesiyle Oluşan Serbest Radikaller …….. 21

1.3.1.3. Moleküle Elektron Eklenmesiyle Oluşan Serbest Radikaller …….. 21

1.3.2. Reaktif Oksijen Türleri …….. 23

1.3.3. Oksidatif Stres …… 25

1.3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri …… 27
1.3.4.1. Enzimatik Antioksidan Maddeler …… 27
1.3.4.1.1. Süperoksit Dismutaz (*SOD*) …….. 27
1.3.4.1.2. Katalaz (*CAT*) …… 29
1.3.4.1.3. Glutatyon Peroksidaz (*GPx*) ……. 29
1.3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Maddeler …… 30
1.3.4.2.1. Glutatyon (GSH) …….. 30
1.3.4.2.2. Tiyoredoksin (Trx) …… 30
1.3.4.2.3. Flavonoidler …….. 30
1.3.4.2.4. Çinko ……. 31
1.3.4.2.5. Melatonin …….. 31
1.3.4.2.6. Koenzim Q10 …… 31
1.3.4.2.7. Selenyum …….. 31
1.3.4.2.8. Metallotiyoneinler ……. 31
1.3.5. Apoptoz ……... 31
1.4. Kanser ……... 32
1.4.1. Kanser Oluşum Mekanizması (Karsinogenezis) …… 34
1.4.2. Karaciğer Kanseri …….. 35
1.4.3. Hepatosellüler Karsinom (HCC) …… 35
1.4.4. Pestisitlerin Kanserojen Etkileri ……. 36
1.5. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Bilgi …… 38
1.5.1. HepG2 ……. 38
1.5.2. Thle-2 …….. 39
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ……... 41
3. MATERYAL VE METOT …….. 45
3.1. Materyal …….. 45
3.1.1. Hücre Hatları …… 45

3.1.2. Kimyasal ve Reaktifler ……. 45

3.1.3. Makine ve Teçhizat ……... 46

3.2. Metot ……... 46

3.2.1. Hücre Kültürü ……... 46

3.2.1.1. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hatlarının İki Boyutlu Geliştirilmesi … 46

3.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması …….. 47

3.2.1.3. Hücre Sayımı …… 47

3.2.2. Sitotoksisite Analizi (XTT Assay) …… 48

3.2.3. Hücre Motilite Testi (Yara İyileştirme Deneyi) …… 48

3.2.4. DAPI Boyama ……... 48

3.2.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu …….. 49

3.2.5.1. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hatlarının RNA İzolasyonu ve DNaz ile muamelesi …… 49

3.2.5.2. İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon ve Saflık Ölçümleri ….. 50

3.2.5.3. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Kontrolü ……... 50

3.2.5.4. cDNA Sentezi …….. 51

3.2.5.5. Gen İfadesi Ölçümü …… 51

3.2.5.6. İstatistiksel Analiz …… 52

4. BULGULAR VE TARTIŞMA …… 53

4.1. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı Sitotoksisite Sonuçları ……..... 53

4.2. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı Motilite Sonuçları ……. 55

4.3. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı DAPI Boyama Sonuçları …….. 59

4.4. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı RNA İzolasyon Sonuçları …… 65

4.5. Thle-2 ve HepG2 Gen Ekspresyon Sonuçları …… 66

4.6. Tartışma …… 71

5. SONUÇ VE ÖNERİLER ……. 77

6. KAYNAKLAR ……. 79

EKLER …….. **95**

EK-1 …… **95**

ÖZGEÇMİŞ …….. **92**

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Selin Özkan KOTİLOĞLU ve Prof. Dr. Serap Yalçın AZARKAN'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca tez sürecimin birkaç ayında benden laboratuvar imkanlarını ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER ve doktora öğrencisi Havva Tezcan ÜNLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yüksek lisansın en başından beri desteğini ve yardımını esirgemeyen arkadaşım Burak DEMİRKAYA'ya ve beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştiren, benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eylül, 2023 Cansu AYDIN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DELTAMETRİN VE ASETAMİPRİD'İN THLE-2 VE HEPG2 HÜCRE HATLARININ ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Cansu AYDIN

KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman:	**Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU**
	Yıl: 2023, Sayfa: 97
Jüri:	**Prof.Dr. Serap YALÇIN AZARKAN**
	Doç. Dr. Dilek AKYÜZLÜ
	Doç. Dr. Fahriye ERCAN
	Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU
	Dr. Öğr. Üyesi Sevinç AKÇAY
İkinci Danışman	**Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN**

Bu çalışmada Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarında deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin sitotoksik, morfolojik ve moleküler etkisinin incelenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca sıkça kullanılan deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin toksik etkileri, Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarında ilk defa kullanılması çalışmaya özgünlük katmaktadır. Tarımsal ilaç olarak kabul edilen pestisitler, böcek, mantar ve yabani otlar gibi zararlıları kontrol edebilmek için onları öldüren kimyasal bileşiklere denilmektedir. Çalışmada kullanılan iki pestisit de böcek öldürücü grubu olan insektisitlere aittir. İnsektisitlerde kimyasal yapılarına göre beş gruba ayrılırlar. Deltametrin piretroid grubu insektisit iken asetamiprid neonikotinoid grubu insektisittir. Pestisitlerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna, apoptotik hücre ölümüne, DNA hasarı ve oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Bu verilere dayanarak Thle-2 ve HepG2 hücre hatları üzerinde deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin toksik etkilerini belirlemek için belli doz aralıklarında optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu tezde yapılan deneyler sonucunda deltametrinin, asetamiprid pestisitinden daha toksik etkide olduğu görülmüştür. Ayrıca Thle-2 hücresinde *CAT*, *SOD1* ve *GSTK1* genlerinin ifadelerinde bir azalma görüldüğü halde HepG2 hücre hattında artışlar da görülmüştür. Bunun sonucunda pestisitlerin, normal karaciğer hücresi olan Thle-2 de oksidatif strese sebep olduğu, karaciğer kanser hücresi olan HepG2 de ise oksidatif stres görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Thle-2, HepG2, Antioksidan, Toksisite, Gen ifadesi.

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

EVALUATION OF THE EFFECTS OF DELTAMETHRIN AND ACETAMIPRID ON ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEMS OF THLE-2 AND HEPG2 CELL LINES

Cansu AYDIN

KIRSEHIR AHI EVRAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Supervisor:	**Asisst. Prof. Dr. Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU**
	Year: 2023, Pages: 97
Juries:	**Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN**
	Assoc. Prof. Dr. Dilek AKYÜZLÜ
	Assoc. Prof. Dr. Fahriye ERCAN
	Assist. Prof. Dr. Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU
	Assist. Prof. Dr. Sevinç AKÇAY
Co-Supervisor	**Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN**

The aim of this study was to investigate the cytotoxic, morphological and molecular effects of deltamethrin and acetamiprid pesticides in Thle-2 and HepG2 cell lines. In addition, the toxic effects of the frequently used pesticides deltamethrin and acetamiprid and their use in Thle-2 and HepG2 cell lines for the first time add originality to the study. Pesticides, which are considered as agricultural pesticides, are chemical compounds that kill pests such as insects, fungi and weeds in order to control them. Both pesticides used in the study belong to insecticides, which are insecticides. Insecticides are divided into five groups according to their chemical structure. Deltamethrin is a pyrethroid insecticide while acetamiprid is a neonicotinoid insecticide. Pesticides are known to cause reactive oxygen species (ROS) formation, apoptotic cell death, DNA damage and oxidative stress. Based on these data, an optimisation study was carried out at certain dose ranges to determine the toxic effects of deltamethrin and acetamiprid pesticides on Thle-2 and HepG2 cell lines. As a result of the experiments conducted in this thesis, deltamethrin was found to be more toxic than acetamiprid pesticide. In addition, although a decrease in the expression of CAT, SOD1 and GSTK1 genes was observed in Thle-2 cells, increases were also observed in HepG2 cell line. As a result, pesticides caused oxidative stress in Thle-2, which is a normal liver cell, while oxidative stress was not observed in HepG2, which is a liver cancer cell.

Keywords: Thle-2, HepG2, Antioxidant, Toxicity, Gene expression.

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1.1.	Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği (TİSİT) Pestisit Sınıflandırılması ……..	**8**
Tablo 1.2.	Temel Pestisitler ve Kullanılan Maddeleri ……...	**9**
Tablo 1.3.	İnsektisitlerin Sınıflandırılması ……	**10**
Tablo 1.4.	Radikal Kaynakları ……	**22**
Tablo 1.5.	İnsanlarda Kanserojen Etkiye Sahip Pestisitler ……	**37**
Tablo 2.1.	Tez ile İlgili Olduğu Düşünülen Makale Sayısı …….	**42**
Tablo 3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler …….	**45**
Tablo 3.2.	Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat ……..	**46**
Tablo 3.3.	İfadesi Ölçülen Genlerin Primer Dizileri, Boyutları ……	**52**
Tablo 4.1.	Thle-2 ve HepG2 Hücre Hatlarının RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları	**65**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Pestisitlerin ekosistem içerisindeki döngüsü …….....	**4**
Şekil 1.2.	Dünyada kullanılan pestisitlerin gruplara göre kullanım yüzdeleri …..	**6**
Şekil 1.3.	Türkiye'deki pestisit kullanımının yıllara göre miktarları	**6**
Şekil 1.4.	Türkiye'de pestisit kullanımının gruplara göre yüzdeleri …….	**7**
Şekil 1.5.	Türkiye'deki bölgelerin pestisit kullanımlarının yüzdeleri ……...	**7**
Şekil 1.6.	Deltametrinin kimyasal yapısı.....	**12**
Şekil 1.7.	Asetamipridin kimyasal yapısı ……..	**18**
Şekil 1.8.	Endojen serbest radikal kaynakları ……...	**22**
Şekil 1.9.	Eksojen serbest radikal kaynakları ……	**23**
Şekil 1.10.	Bazı reaktif oksijen türleri …….	**24**
Şekil 1.11.	Oksidatif stres sonucunda organizmada meydana gelebilecek reaksiyonların özeti ……...	**26**
Şekil 1.12.	Normal hücreyle kanser hücresinin çoğalması …….	**32**
Şekil 1.13.	Sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin farkı ……...	**33**
Şekil 1.14.	Karsinogenezisin oluşum süreci ……	**34**
Şekil 1.15.	HCC risk faktörleri ……	**36**
Şekil 1.16.	HCC'nin oluşum evreleri ……..	**36**
Şekil 1.17.	HepG2 ……...	**38**
Şekil 1.18.	Thle-2 ……	**39**
Şekil 3.1.	Flask ortamındaki hücreler ……	**46**
Şekil 4.1.	Thle-2 hücre hattının 100 mM deltametrin ile muamelesi ……	**53**
Şekil 4.2.	Thle-2 hücre hattının 250 mM asetamiprid ile muamelesi ……...	**53**
Şekil 4.3.	Thle-2 hücre hattı kontrol …….	**54**
Şekil 4.4.	HepG2 hücre hattının deltametrin sitotoksisitesi …….	**54**
Şekil 4.5.	HepG2 hücre hattının asetamiprid sitotoksisitesi ……	**55**
Şekil 4.6.	Thle-2 kontrol migrasyon …….	**55**
Şekil 4.7.	Thle-2 100 mM deltametrin uygulaması ……..	**56**
Şekil 4.8.	Thle-2 250 mM asetamiprid uygulaması ……..	**56**
Şekil 4.9.	Thle-2 10mM deltametrin + 225 mM asetamiprid karışımı …….	**57**
Şekil 4.10.	HepG2 Kontrol …….	**57**
Şekil 4.11.	HepG2 710 mM deltametrin uygulaması ……..	**58**
Şekil 4.12.	HepG2 2940 mM asetamiprid uygulaması ……...	**58**
Şekil 4.13.	HepG2 300 mM deltametrin + 500 mM asetamiprid Karışımı……..	**59**

Şekil 4.14.	Thle-2 24.saat kontrol grubu …….	**59**
Şekil 4.15.	Thle-2 48.saat kontrol grubu …….	**60**
Şekil 4.16.	Thle-2 100mM deltametrin 24.saat görüntüsü ……	**60**
Şekil 4.17.	Thle-2 100mM deltametrin 48.saat görüntüsü ……	**60**
Şekil 4.18.	Thle-2 250mM asetamiprid 24.saat görüntüsü ……	**61**
Şekil 4.19.	Thle-2 250mM asetamiprid 48.saat görüntüsü ……	**61**
Şekil 4.20.	Thle-2 deltametrin (10mM) + asetamiprid (225mM) 24.saat görüntüsü……	**61**
Şekil 4.21.	Thle-2 deltametrin (10mM) + asetamiprid (225mM) 48.saat görüntüsü …….....	**62**
Şekil 4.22.	HepG2 24.saat kontrol grubu ……	**62**
Şekil 4.23.	HepG2 48.saat kontrol grubu ……	**63**
Şekil 4.24.	HepG2 710 mM deltametrin 24.saat görüntüsü ……	**63**
Şekil 4.25.	HepG2 710 mM deltametrin 48.saat görüntüsü ……	**63**
Şekil 4.26.	HepG2 710 mM deltametrin 48.saat birleşim görüntüsü ……..	**64**
Şekil 4.27.	HepG2 asetamiprid 2940 mM 24.saat görüntüsü ……..	**64**
Şekil 4.28.	HepG2 asetamiprid 2940 mM 48.saat görüntüsü ……..	**64**
Şekil 4.29.	HepG2 deltametrin (300 mM) + asetamiprid (500 mM) 24.saat görüntüsü ……...	**65**
Şekil 4.30.	HepG2 deltametrin (300 mM) + asetamiprid (500 mM) 48.saat görüntüsü ……...	**65**
Şekil 4.31.	Gen ifadesi ölçümü için kullanılan primer çiftlerinin erime eğrileri….	**67**
Şekil 4.32.	Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *CAT* gen ifadesinin değişimi ……..	**68**
Şekil 4.33.	Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *GSTK1* gen ifadesinin değişimi ……...	**68**
Şekil 4.34.	Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *SOD1* gen ifadesinin değişimi ……...	**69**
Şekil 4.35.	HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *CAT* gen ifadesinin değişimi ……...	**70**
Şekil 4.36.	HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *GSTK1* gen ifadesinin değişimi ……...	**70**
Şekil 4.37.	HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *SOD1* gen ifadesinin değişimi ……...	**71**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler		Açıklama
μL	:	Mikrolitre
μM	:	Makromolar
Na^{+}	:	Sodyum
Ca^{+2}	:	Kalsiyum
O_2	:	Oksijen
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
OH	:	Hidroksil radikali
mM	:	Mikromolar

Kısaltmalar		Açıklama
CAT	:	Katalaz
DAPI	:	4,6-diamidine-2-'phenylindole
DEPC	:	Dietil piroKarbonat
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Etilen Diaminetetraasetik Asit
FBS	:	Fetal Sığır Serumu
GABAA	:	Gama amino butirik asit tip A reseptörü
GP_X	:	Glutatyon Peroksidaz
GSTK1	:	Glutatyon S transferaz
GSH	:	Glutatyon
HepG2	:	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HCC	:	Hepatosellüler karsinom
IARC	:	Uluslararası kanser araştırma kuruluşu
LD_{50}, IC_{50}	:	Ortalama Öldürücü Doz, Inhibition Concentration % 50
MDA	:	Malondialdehit
MRL	:	Maksimum Kalıntı Düzeyi
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
nAChR	:	Nikotinik asetilkolin reseptörü
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
RNA	:	Ribonükleik asid
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
THİA	:	Thiakloprid
THLE-2	:	Dönüştürülmüş İnsan Karaciğer Epitel-2
TrxR	:	Tiyoredoksin redüstaz
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Pestisitler

Tarım ürünlerini, zararlı organizmaların (haşere, mikroorganizma ve diğer zararlılar) etkilerinden korumak için sentetik veya doğal yollardan elde edilip üretimi yapılan maddelere pestisit denir (Kaygısız, 2003). Çok eski zamanlardan beri kullanıldığı düşünülen pestisitlerin ilk kayıtları M.Ö. 1500 yıllarına ait olduğu belirlenen piparüsler üzerinde bulunmuştur.

Pestisitlerin hedef olmayan canlılar ve insanlar üzerinde olumsuz etkilerinin görülmesinin ve insan vücudunda pestisit kalıntılarının bulunmasının ardından bu zirai ilaçların zararlı etkileri araştırılmaya başlanmıştır (Arfat ve ark., 2014). Akut ve kronik pestisit zehirlenme sonucunda insanda pek çok yan etki geliştiği de rapor edilmiştir. Bunlara kanser, alerjik reaksiyonlar ve sinir sistemi tahribatlarının yanında öğrenme güçlüğü, hafıza kaybı ve bilişsel becerilerde bozulmalar örnek verilebilir. Ayrıca pestisitler, insanlar ve diğer birçok canlı için hayati öneme sahip olan DNA'da mutasyona ve enzim fonksiyonlarında bozulmalara yol açmaktadır (Kaya, 2019).

Pestisitlerin sahip olması gereken kalıntı değerleri, 1960 yılında Gıda Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ortak yaptığı geniş çaplı araştırmalar sonucunda kurulan ''Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi'' tarafınca açıklanmıştır. Ancak pestisitlerin aşırı ve bilinçsizce kullanılması, çevreyi ve insan sağlığını olumsuz etkileyerek pek çok sorun ortaya çıkmıştır. Tarımsal üretimin temel taşı olarak kabul edilen pestisitlerin kullanımlarının kontrolü, kalıntılarının sahip olduğu sağlık riskleri nedeniyle hayati önem arz etmektedir. (Kaya, 2019). Türkiye'de pestisitler ile ilgili düzenlemeler 25 Kasım 2016 yılında Türk Gıda Kodeksi, Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği ile yapılmıştır. Her pestisit için ayrı ayrı bildirilen Maksimum Kalıntı Düzeyleri (Maximum Residue Levels, MRL) ruhsatlı bir pestisit için ürünlerde bulunmasına izin verilen maksimum limit olarak tanımlanabilir. MRL'nin belirlenme amacı; o üründe pestisit için ruhsatlanan ve hesaplanan MRL değeri üzerinden risk değerlendirmesini yapmaktır (Tözün ve Akar, 2022).

Türkiye'de, pestisit kullanımı sonucu ürünlerdeki kalıntı değerlerinin belirlenmesi amacıyla 2010 yılı ve sonrası diliminde değerlendiren bir derleme çalışması yapılmıştır. MRL değerlerinin bazı pestisitler için önerilen düzeyi aşmadığı fakat bazı pestisitlerde ise MRL düzeyinin üzerinde olduğıu bildirilmiştir (Tözün ve Akar, 2022). Ersoy ve

arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada, Türkiye'de kullanımı yasak olan asetamiprid maddesinin üzümde, chlorpyrifos maddesinin ise çilekte MRL düzeylerini aşan seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Ersoy ve arkadaşlarının (2011), sert çekirdekli meyve (erik, kayısı, kiraz, nektarı, şeftali, vişne) ve sert kabuklu meyvelerle (Antep fıstığı, badem, ceviz, fındık) yaptığı bir diğer çalışmasında, kayısıda amitraz maddesinin düzeyinin MRL değerini altı kat aştığı, kirazda ise yine Türkiye'de kullanımı yasak olan monocrotophas maddesine rastlandığı bildirilmiştir. Bunlara ek olarak şeftalide chlorpyrifos düzeyinin MRL değerini beş kat aştığı raporlanmıştır (Tözün ve Akar, 2022).

Zararlı böcekleri yok etmek için yaygın bir şekilde kullanılan pestisitler, çevremizin her yerinde bulunabilmektedir. Buna bağlı olarak bizler gibi hedef olmayan organizmalar, yüksek derecede toksik, biyolojik olarak bozulmayan ve uzun süre çevrede kalabilen maddeler olan pestisitlere kaçınılmaz olarak maruz kalmaktadırlar (Karabıyık, 2019). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, pestisitlerin insan hücrelerinde ne tür etkilere yol açtığı önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmakta ve kullanımlarındaki güvenlik sorununu belirlemek açısından öncelik teşkil etmektedir.

1.1.1. Pestisitlerin yapısı

Latince 'de ''Pest'', zararlı anlamına, ''Cide'' ise öldüren veya öldürme eylemi anlamına gelmektedirler. Bu iki kelimenin birleşmesi ile oluşan pesticide (pestisit) terimi, haşere ilaçlarını, organizmayı biyolojik olarak kontrol edici maddeleri ve çevre koruma ilaçlarını içermektedir. Üretimleri sentetik veya bitkilerden olabilir. Pestisitler saf olarak değil formülasyon halinde tarım ilacı olarak kullanılırlar (Öncüer, 2000; Kaya, 2019).

Pestisit yapısında, etkili madde, dolgu maddesi ve diğer maddeler olmak üzere üç ana kısım vardır. Etkili madde kısmı, öldürücü etkiye sahip olan kısımdır. Dolgu maddesi, bitkilerle veya herhangi bir kimyasal birleşikle kimyasal olarak etkileşime girmeyen kısımdır. Diğer maddeler ise bitkiler için zehirliliği azaltan bileşikler, pestisitin tesirini ve dayanma süresini arttıran kısımdır (Öncüer, 2000).

1.1.2. Pestisitlerin vücuda alınma yolları

1.1.2.1. Göz temasıyla

Pestisitlerin göz ile teması ilaçların paketlenme ve tanklara konulduğu sırada meydana gelebilir. Bu tehlikeyi önlemek için çalışanların kontak lens veya koruyucu gözlük takmaları gerekmektedir (Kaya, 2019).

1.1.2.2. Ağız temasıyla

Pestisit uygulaması yapan tarım çalışanlarının, uygulama sonrasında ellerini yıkamadan yiyecekleri yemesi ya da sigara içmesi sonucu temas gerçekleşebilir (Kaya, 2019). Ayrıca MRL değerini aşan ürünlerin, tüketiciler tarafından yenilmesi ile maruziyet gerçekleşebilir.

2009 yılında yapılan bir çalışmada, Çukurova Üniversitesi Hastanesi Acil Bölümü'ne akut zehirlenme sebebiyle gelen 2469 kişiden %23,9'u organofosforlu pestisite maruz kalan kişiler olduğu bildirilmiştir (Satar ve ark., 2009).

1.1.2.3. Solunum ile

Sıvı veya toz biçimdeki ilaçların üretimi ya da uygulama sırasında bir kısım pestisit havada asılı kalır. Bu havanın solunumu sonucunda maruziyet gerçekleşebilir. Buharlaşma özelliği çok yüksek olan fumigant ilaçlara maruziyet daha fazla görülmektedir (Çetinkaya Açar, 2015).

1.1.2.4. Deri temasıyla

Pestisitlerin deri ile temas etmesi sonucunda absorbsiyon farklı sürelerde gerçekleşebilir. Bu süre, pestisitlerin emilme özelliğine ve vücudun hangi kısmı ile temas ettiğine bağlı olarak değişir. Deride emilimin en çok olduğu kısım ön koldur. Yine de insan vücudunun tümü risk altındadır (Kaya, 2019).

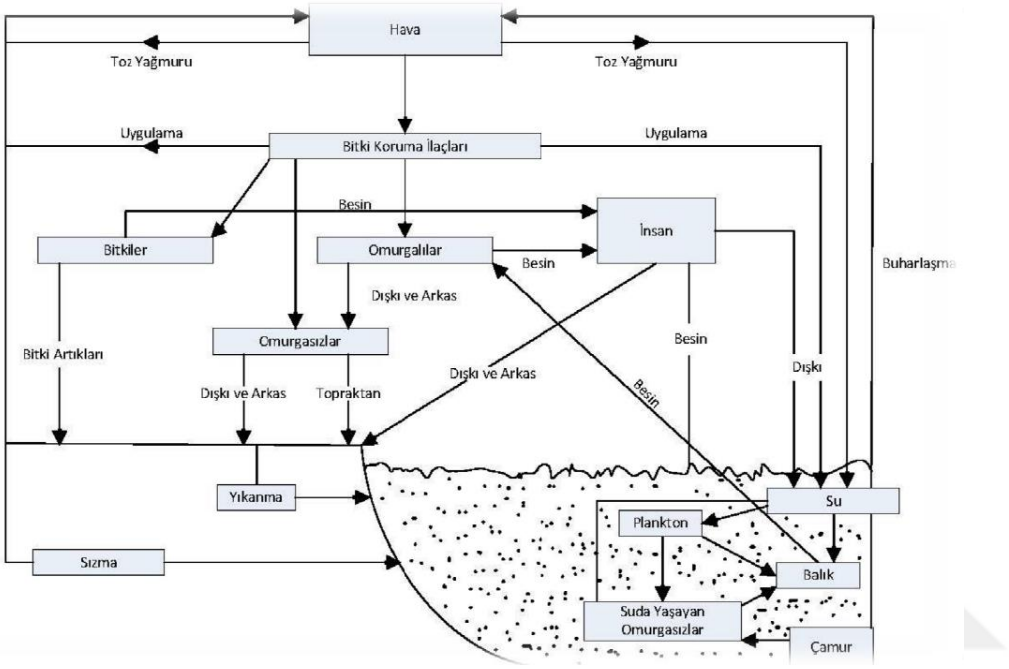
1.1.3. Pestisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri

1.1.3.1. Pestisitlerin çevre üzerine etkileri

Pestisitlerin amacı, tarım ürünlerinden yeterince verim alabilmektedir. Ama bunu sağlamaya çalışırken insanlar, hayvanlar ve çevre olumsuz şekilde etkilenmektedir. Pestisitler kullanıldıklarında ekosisteme katılarak suya, havaya ve toprağa karışıp oradan da canlılara geçmektedir. Pestisitlerin çevre üzerindeki bu etkileri, iklim ve tarımsal koşullara, pestisitin kimyasal ve fiziksel özelliğine, formülasyon tipine ve uygulanma şekline göre değişmektedir (Yıldırım, 2008).

Pestisit uygulaması yapıldıktan sonra sadece uygulanan yerde değil başka bölgelere taşınarak da olumsuz etkilere sebep olmaktadır (Vural, 2005). Pestisitlerin bir bölümü buharlaşma ile havaya karışarak rüzgarla taşınır. Ayrıca yağmur, kar ve sis gibi doğal

olaylar ile tekrar yeryüzüne dönmektedir (Şekil 1.1.). Su, canlıların en hayati yaşam kaynaklarındandır. Su kaynaklarının içinde bulunan ve zamanla biriken pestisit kalıntıları çözünmeden uzun süre suda kalabilirler (Altıkat ve ark., 2009). Bu şekilde besin zincirine dahil olan pestisitler, suda yaşayan canlılara zarar verirler dolayısıyla insan sağlığına da olumsuz etkileri gerçekleşebilir (Kaya, 2019).



Şekil 1.1. Pestisitlerin ekosistem içerisindeki döngüsü (Sulak ve Yatmaz, 2012)

1.1.3.2. Pestisitlerin insan sağlığı üzerine etkileri

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre pestisit zehirlenmeleri akut ve kaza olarak gerçekleşmektedir. Dünyada 3.5-5 milyon civarında pestisit zehirlenmesinin olduğu ve yaklaşık 20.000'inin ölümle sonuçlandığı belirtilmiştir (Kaya, 2019). Pestisit maddeler ile çalışan meslek grubundaki zehirlenmeler, akut zehirlenmeye örnek verilebilir. Bu akut zehirlenmeler üretim, formülasyon hazırlama, taşıma, yükleme ve uygulama sırasında deri ya da solunum yolu ile maruz kalması sonucu görülmektedir. (Yeter, 2007). Akut zehirlenme sonucunda deride alerjik döküntüler, solunum rahatsızlıkları ve kardiyovasküler sistem hastalıkları görülmektedir. Ayrıca kronik zehirlenmeler de 2 milyon civarında olup, bunların da 200.000'inin ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Kronik etki olarak kişilerde kanser, doğum kusurları, sinir sisteminde toksik etkiler ve üreme sistemi üzerinde istenilmeyen etkiler görülmektedir (Kaya, 2019).

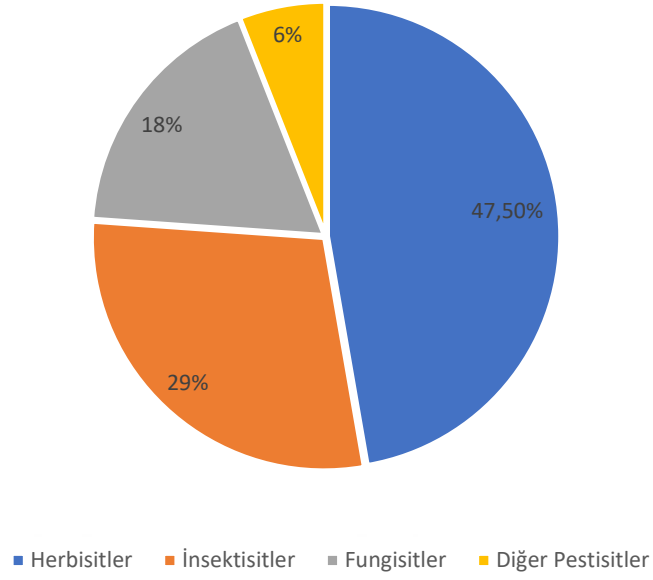
Pestisitler, haşereler, yabani otlar gibi istenilmeyen organizmaların öldürülmesi için kullanılırlar (DSÖ, 2016). Kimyasal açıdan çok çeşidi bulunduğu için pestisitlere maruz kalan organizmalarda oldukça çeşitli yan etkiler gözlemlenir. Rapor edilmiş bazı yan etkiler;

- Parkinson hastalığı gibi nörolojik bozukluklar (Sanders ve ark., 2017),
- Astım gibi solunum yolu hastalıkları (Phua ve ark., 2009),
- Şeker hastalığı gibi metabolik hastalıklar (Everett ve ark., 2018),
- Gelişim bozuklukları (Hoy ve Swanson, 2015),
- Lösemi gibi kanser türleri (Ma ve ark., 2002; Belson ve ark., 2007),
- Konjenital kalp bozuklukları (Carmichael ve ark., 2014),
- Nöral tüp bozuklukları (Yang ve ark., 2014),
- Otizm spektrum hastalıklarıdır (Keil ve ark., 2014).

1.1.4. Pestisitlerin kullanım amaçları ve kullanım oranları

Hızlı bir şekilde artan dünya nüfusu sonucu tarım alanları yetersiz hale gelmiştir. Tarımda ekim alanlarının azalmasıyla pekçok sorun ortaya çıkmaya başlamıştır. Hem artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak hem de tarımda üretilen ürünlerden yüksek verim alabilmek için bitkilere zarar veren böcek ve hastalık etmenlerine karşı mücadele etmek zorunluluk haline gelmiştir. Bu mücadeleye 1600'lü yıllarda başlanıldığı bilinmektedir (Kaygısız, 2003). 25.000'den fazla pestisit çeşidi 1600'lü yıllardan başlayarak günümüze kadar sentezlenip piyasaya sunulmuştur. Piyasaya sunulan pestisitlerden %75-80'ini herbisit ve insektisit grubu pestisitler kapsamaktadır (İstanbulluoglu ve Tekbas, 2013). Pestisitlerin başlıca kullanım alanları şu şekildedir;

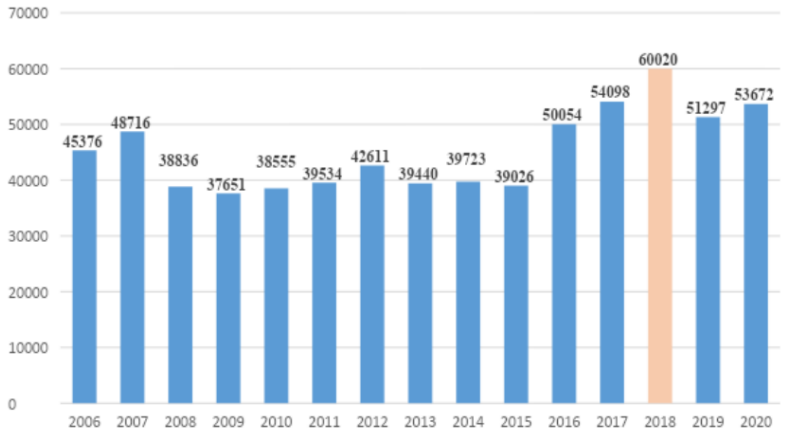
- Tarımsal üretim
- Bahçecilik-Hayvancılık-Ormancılık
- Balık yetiştiriciliği-Balık tarımı
- Boyalar
- Duvar kâğıdı yapıştırıcıları
- Endüstriyel böcek kontrolü
- Deniz böcek kontrolü
- Gıdaların uzun süre saklanması (Kaya, 2019).



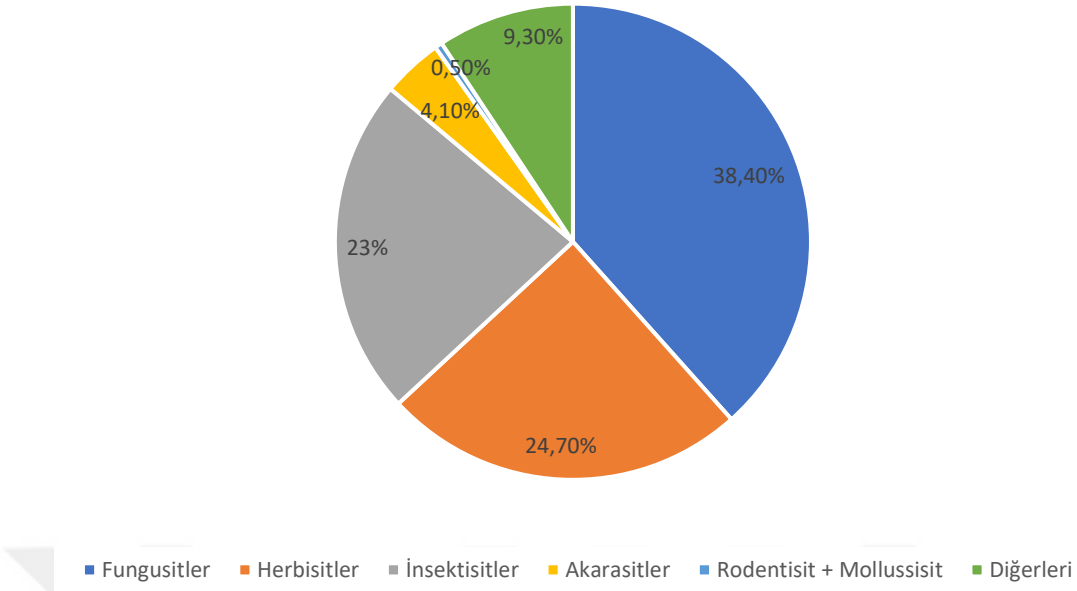
Şekil 1.2. Dünyada kullanılan pestisitlerin gruplara göre kullanım yüzdeleri (Kaya, 2019)

Pestisitlerin kullanılması ülkelerin gelişmişlik düzeyleri, iklim koşulları, zararlıların çeşitleri, tarım alanlarının oranı gibi pek çok faktöre bağlıdır. Dünyadaki yıllık pestisit üretimi 3 milyon ton civarında olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 1.2.) (Kaya, 2019).

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de pestisit kullanımı her geçen yıl artmaktadır. TÜİK verilerine göre, 2006 yılında 45 bin ton miktarındaki pestisit kullanımı, 2020 yılına gelindiğinde %17,7 oranında artışla 53 bin ton kullanım olmuştur (Şekil 1.3.). (Kaya, 2019).

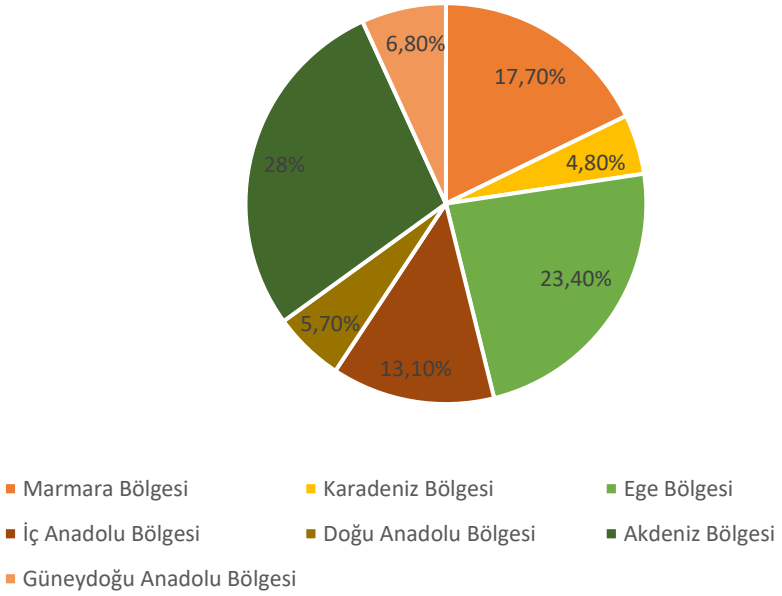


Şekil 1.3. Türkiye'deki pestisit kullanımının yıllara göre miktarları (Özercan ve Taşcı, 2022).



Şekil 1.4. Türkiye'de pestisit kullanımının gruplara göre yüzdeleri (TÜİK,2022)

Türkiye'deki bölgelerin pestisit kullanımları incelendiğinde, Akdeniz Bölgesi'nde 15 bin ton pestisit kullanımı ile ilk sırada yer almaktadır. Ege Bölgesinde 12,8 bin ton ve Marmara Bölgesi'nde 9,5 bin ton pestisit kullanılmıştır. Bu ilk üç bölgenin toplam pestisit miktarı, Türkiye'de kullanılan pestisitlerin %69,6'sını oluşturmaktadır (Kaya, 2019).



Şekil 1.5. Türkiye'deki bölgelerin pestisit kullanımlarının yüzdeleri (Özercan ve Taşcı, 2022)

Akdeniz Bölgesi'ndeki ürün çeşitliliği, seranın çok olması ve tarımsal ürün ticaretinin çok olmasından dolayı pestisitin en yoğun (%28) kullanıldığı bölgedir. Yıl içerisinde birden çok ürün almada en elverişli koşullara sahip olan Akdeniz Bölgesi'nde, buğday, çeltik, pamuk, turunçgiller, muz, haşhaş, şeker pancarı, zeytin, üzüm, soya fasulyesi, mısır ve yer fıstığı başlıca tarım ürünlerindendir (TRGM, 2021).

1.1.5. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitlerin sınıflandırılması birçok şekilde yapılmaktadır. Genel olarak görünüş özellikleri, fiziksel yapıları ve formüle edilme şekilleri gibi sınıflandırılsalar da etkiledikleri zararlı ve hastalık grupları ile de sınıflandırılabilirler (Öncüer, 2000).

Tablo 1.1. Tarım İlaçları Sanayici, İthalatçı ve Temsilcileri Derneği (TİSİT) Pestisit Sınıflandırılması

Formülasyon Şekillerine Göre	**Toz ilaçlar, peletler, tabletler, kuru tohum ilaçları, granüller, aerosoller ve diğerleri.**
Etkiledikleri Zararlı Gruplara Göre	İnsektisit, akarasit, nematisit, mollussisit, rodentisit, algisit, herbisit, fungisit, bakterisit, afisit, avisit.
Kullanım Tekniklerine Göre	Doğrudan kullanılan ilaçlar ya da su ve organik çözücüler ile seyreltilerek kullanılan ilaçlar.
Etkiledikleri Zararlıların Biyolojik Dönemine Göre	Larvasit, ovisit ve ovalarvasit.
Zararlıları Etkidikleri Yollara Göre	Mide ve solunum zehirlenmeleri, bitkilerde ise sistematik veya yarı sistematik zehirlenmeler.
Toksik Özelliklerine Göre	Fiziksel, sinir sistemi, solunum ve sitoplazma zehirlileri, antiguagulantlar.
Zararlıların Bulunduğu Yerlere Göre	Kültür bitkilerinde, depodaki ürünlerde, ev böceklerinde, keresteler ve ormanlarda, hastalık vektörlerinde ve insanlardaki dış parazitlere karşı kullanılanlar.
İlacın Fiziki Haline Göre	Katı ve likit formülasyon
Bileşimindeki Etkili Madde Gruplarına Göre	İnsektisitler, akarisitler, fumigantlar ve nematisitler, rodentisitler ve mollussitler, fungusitler, herbisitler ve diğer maddeler.

Tablo 1.2. Temel Pestisitler ve Kullanılan Maddeleri (Ünel, 2022)

Pestisitler	Kullanılan Maddeler
İnsektisitler (Böcek öldürücüler)	DTT, Asetamiprid, Deltametrin, Argenik bileşikleri, Malatyon, Klorprifos, Endosülfan, Aldrin vb.
Herbisitler (Yabani ot öldürücüler)	Paraquat, Glifosat, Kerosen, Metalaksil vb.
Fungusitler (Mantar öldürücüler)	Pentaklorofenol, Kükürt, Metalik bakıra eş değer bordo bulamacı, Tirem vb.
Bitki Gelişim Düzenleyiciler	6-benzil adenin, Mepiquat klorür vb.
Rodentisitler (Kemirgen öldürücüler)	Warfarin, Coumatetralyl, Florasetamit vb.

1.1.6. Pestisitlerin genotoksik etkileri

Pestisitlerin daha önceki bölümlerde bahsedilen hastalıkların dışında genotoksik etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (Gómez-Arroyo ve ark., 2000; Bolognesi, 2003; Bull ve ark., 2006; Bolognesi ve ark., 2009; Martínez-Valenzuela ve ark., 2009; González-Mille ve ark., 2010). Ayrıca hayvan modellerinde *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda (Martínez-Paz ve ark., 2013) ve *in vitro* yapılan çalışmalarda (Koller ve ark., 2012) kardeş kromatitlerin değiştiği (KKD), DNA kırıkları gibi anormallikler gözlemlenmiştir. Ayrıca doğum önceki pestisit maruziyetine dikkat çekmek için yapılan bir çalışmada, yeni doğmuş bebeklerim mekonyumlarından farklı pestisitler tespit edilmiştir. Özellikle propoksur ve sipermetrin pestisitlerinin fazla görülmesinden dolayı bu iki pestisit üzerinde çalışmalara devam edilmiştir. Doğum öncesinde propoksur ve sipermetrin pestisitlerine maruz kalan bebeklerde, çocukluk çağına geldiklerinde lösemiyle ilişkili kromozomal translokasyonların oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (LaFiura ve ark., 2007).

1.2. İnsektisitler

Tarımsal faaliyetlerin fazla olduğu ülkelerde yaygın olarak kullanılan insektisitler, hedef organizmanın yani böcekler üzerinde toksik etki gösterirler. Tablo 1.3' de gösterildiği gibi, kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar (Vural, 2005).

Tablo 1.3. İnsektisitlerin Sınıflandırılması (Vural, 2005; Tomizawa ve Casida, 2005)

İnsektisitler				
Organoklorlular	**Organofosfatlar**	**Karbamatlar**	**Piretroidler**	**Neonikotinoid**
Aldrin	Acefane	Aldoksikarb	d-Fenrotrin	Nithiazine
DDT	Demeton	Aminokarb	Fenvalerat	İmidacloprid
Dieldrin	Naled	Bendiokarb	Alletrin	Thiamethoxam
Endrin	Bromofos	Aldikarb	Bioresmetrin	Prototype
Endosülfan	Diazinon	Demithalan	Bioalletrin	Thiacloprid
Klordan	Triklorfon	Baygon	Bifentrin	Clothianidin
Metosiklor	Ometoat	Karbaril	Deltametrin	Nitenpyram
Heptaklor	Ethion	Karbosulfan	Etoksazole	Acetamiprid
Lindan	Fention	Zektan	Cyflutrin	Dinotefuran
Toksafen	Paration metil	Tiyodikard	Fenpropantrin	
	Fenklorfos	Karbofuran	Tetrametrin	
	Fenamifos	Methonil	Sialotrin	
	Mevinfos	Propoks	Permetrin	
	Malation	Pirimikarb	Resmetrin	
	Fosfamidon	Oksamil	Sipermetrin	
	Fosfolan			
	Klorprifos			

1.2.1. Piretroid grubu insektisitler

1.2.1.1. Piretroidlerin genel özellikleri

Piretrum, krizantem (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) bitkisinin kurutulmasıyla çiçeklerinden elde edilmiş insektisittir. İlk kez Çinliler tarafından M.S. 1. yüzyılda keşfedilmiştir. En güvenilir kabul edilen ve bu yüzden de en çok kullanılan insektisit grubudur. Piretroidler, krizantemik ve piretrik asitleri ile piretrol ve sinerol alkollerden birinin eşleşmesiyle oluşan esterlerdir (Kaymak, 2011).

Doğal piretrinlerin kimyasal yapıları hızlı bozulması ve yüksek maliyette olmalarından dolayı sentetik piretrinler üretilmiştir. Bu sentetik piretrinler, doğal piretrinlere azot, kükürt ve halojen grupları eklenerek elde edilmiştir. Ayrıca bu sentetik piretrinlere piretroitler de denilmektedir (Elliott, 1980). Piretroitler, kimyasal olarak alfa-siyano grubu içerip içermemelerine göre ikiye ayrılırlar. Alfa-siyano grubu içermeyen piretroid grubu Tip I (alletrin, permethrin, tetrametrin, piretrinler), alfa-siyano grubunu içerenlere ise Tip II piretroidler (deltametrin, cypermethrin) olarak bilinmektedir (Barlow ve ark., 2001).

İlk sentetik piretroidler olan alletrin ve sitletrin, 1949'da sentez edilmişlerdir. Bunlar ışığa dayanıksız ve aktiviteleri doğal piretroidlere göre oldukça düşük olduklarından üzerinde çalışmalar yapılmaya devam edilmiştir. 1980'li yıllarda piretrioidlerin üretimi hızlı bir şekilde artmıştır (Kaymak, 2011). Aşırı güçlü ve ışığa hassasiyeti olan, kısa

ömürlü bioresmetrin, krizantemik asit kısmında iki klor atomu ve fenil eter grubu içeren permetrin, krizantemik asit kısmında iki brom içeren deltametrin üretilmiştir (Koç, 2008). Bu sentetik piretroidler, küresel olarak kullanılan insektisitlerin %30'undan fazlasını kapsamaktadırlar (Prasanthi ve ark., 2005).

Piretroidler mide, karaciğer, böbrek, bağırsak ve sinir sisteminde hızlı bir şekilde yayılırlar. Memelilerin karaciğerinde detoksifiyeye edilen piretroidler (Yavuz, 2007), hedef olan organizmalarda detoksifiye edilmezler ve böylece kalıntı ve birikimleriyle ciddi problemlere yol açarlar (Fırat ve Aytekin, 2018).

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın konutlarda ve tarımsal alanlarda organofosfat insektisitlerin kullanımını azaltma kararından dolayı piretrin ve piretroid insektisitlerin kullanımı artmıştır (Power ve Sudakin, 2007). Her ne kadar memeliler bir şekilde hidrolize edebilseler bile, kronik olarak insektisitlere maruz kaldıklarında önemli toksik etkiler gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda yapılan çeşitli araştırmalar ild piretroid maruziyetinin farklı organlarda, hücrelerde oksidatif hasara neden olabileceği gösterilmiştir (Bradberry ve ark., 2005; Nasuti ve ark., 2007).

1.2.1.2. Piretroidlerin toksik etki mekanizmaları

Piretroidler diğer insektisit sınıflarına göre daha hidrofobiktir. Bu özelliğinden dolayı etki bölgesi biyolojik zardadır (Michelangeli ve ark., 1990). Piretrioidlerin ana hedefi, nöronal zardaki sodyum kanalıdır (Soderlund ve Bloomquist, 1989). Na^+ kanalına gösterdikleri bu ilgi nedeniyle, Na^+ akımının sürekli artmasına ve nöronların depolarize kalmalarına neden olurlar. Her iki tip piretroid de aynı etkiye sahip olmasına rağmen, Tip II daha etkilidir. Bunun nedeni Tip II'nin, Na^+ kanallarını daha uzun açık kalmasına ve binlerce kez tekrar eden impluslara yol açmasıdır (Ertürk, 2019). Gama amino butirik asit tip A (GABAA) reseptörünün inhibisyonu, Tip II piretroidler için önerilen bir mekanizmadır (Narahashi, 1991).

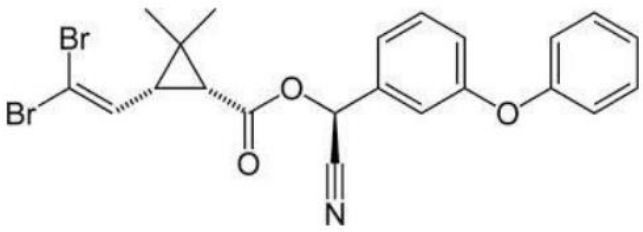
Tip I ve Tip II piretroidler, memelilerin etki mekanizmalarında ve oluşturdukları metabolik bozukluklar bakımından farklılık gösterirler. Tip I piretroidler, hareketsiz kalma, koordinasyon bozukluğu, titreme, aşırı yorgunluk, ataksi, agresif davranışlar ve felç görülebilir. Tip II piretroidlerde ise, hiperaktivite, tükürük salgısının artması, kasılma ve titreme nöbetleri ve felç görülebilir (Ertürk, 2019).

1.2.1.3. Piretroidlerin biyolojik metabolizması

Piretroidler, vücutta emildikten sonra başlıca yağ doku, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek ve sinir sistemine hızlı bir şekilde dağılırlar. Piretroidler memelilerde karaciğer de bulunan hidrolazlar ve sitokrom-P450 bağlı monooksigenazlar tarafından metabolize edilerek pestisitleri asit ve alkole dönüştürürler (Crawford ve ark., 1981). Ticari piretroidlerin en önemli molekül yapısı ester grubudur. Memelilerde *in vivo* olarak detoksifikasyonun ilk aşamasında spesifik olmayan karboksilazlar tarafından estere ayrılırlar. Bu ayrılmadan sonra sitokrom-P450 sisteminde hidroksilaz reaksiyonları ve birkaç konjugasyon reaksiyonlarını takip eder (Heder ve ark., 2001).

1.2.1.4. Deltametrinin genel özellikleri

Deltametrin ((S)-α-cyano-3-phenoxybenzyl, (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate), dünyada en çok tercih edilen insektisittir. Ayrıca, pestisitlerin içinde en güvenli olarak bilinen sentetik piretroid pestisitler içinde yer almaktadır. Uzun zamandır kullanılan bu pestisitin toksik etkisi çok nadir görülür. Sentetik piretroidlerin insektisidal aktivitelerini arttırmak için yapılarına siyano grubu eklenir. Oluşan α siyano grup tip II piretroidler, lipofilik özelliktedirler ve bu sayede suda çözünmezler. Bu özellikleri sayesinde hava, ışık vs. gibi fiziksel çevreden etkilenmeden uzun süre bozulmadan durabilirler.



Şekil 1.6. Deltametrinin kimyasal yapısı (Gacar, 2016)

Deltametrin, böcekleri sindirim yoluyla ya da temas yoluyla etkilemesinin yanında lipofilik özelliği sayesinde böcek ve akarların kütikülasını kolay bir şekilde geçerler. Bu tür özellikleri olmasından dolayı insektisidal etkileri fazladır (US Department of Health and Human Services, 2003).

Yapılan hayvan deneylerinde oral olarak alınan deltametrinin, kandaki ana bileşiklerinde ya da metabolitlerinde alınan dozun %14-70 arasında bir değerde plazmaya geçtiği gözlenmiştir. Dolaşıma katılan deltametrin, tüm sinir sistemindeki dokularda ve beynin bazı kısımlarında kalıntıları tespit edilmiştir (Pesticide Residues in Food, 2000).

Kandaki yarılanma ömrü 5,5 saat olan deltametrin, lipofilik özelliklerinden dolayı hızlıca dolaşıma katılır. Ayrıca yine lipofilik özellikleri sayesinde başta merkezi sinir sistemi (MSS) dokuları olmak üzere birçok dokuya dağılım gösterebilir (Anadon ve ark., 1996).

Piretrin ve piretroidlerin arasında yapısal bir fark olmasına rağmen memeli türlerinde etki ettikleri metabolik yolaklar benzer özellik göstermektedir. Özellikle gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde hidrolize edilirler. Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada oral yolla 0.64 – 1.6 mg/kg vücut ağırlığı dozunda deltametrine maruz kaldıklarında yapısındaki asit, alkol ve siyano grubu moleküller farklı metabolitleri açığa çıkardığı gözlenmiştir (Committee for Medicina Products for Veterinary Use Deltamethrin Summary Report 4).

Deltametrinin açığa çıkan en belirgin metaboliti tiyosinattır. Diğer metabolitler ise; PBA (3-fenoksibenzoik asit), 4'-OH-PB acidsulfate (4'-hydroxy-3- phenoxybenzoic acidsulfate), Br2CA(3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethyl cyclo propane carboxylic acid)'dır (PesticideResidues in Food 2000). Deltametrinin metabolizmasında bulunan stereospesifite, trans-izomer yapıda olan cis-izomerlere kıyasla daha hızlı hidrolize olurlar ve bu nedenle oksidasyon önemli bir metabolik yolak olarak görev alır. Bu metabolik yolaklar karaciğer ve diğer organlarda meydana gelebilir. Ayrıca toksisitesinin azalması, ester bağlarının parçalanmasından kaynaklanmaktadır (U.S. Department of Health and Human Services, 2003).

Deltametrin böcekler üzerinde kullanılan kuvvetli bir insektisittir. Rezidüel etkisi oldukça yüksek olan bu pestisit ayrıca su ürünleri yetiştiriciliğinde de kullanılır. Kullanılan su ve su ürünlerinde, planktonik organizmalarda ve balıklarda deltametrinin birikmesi sonucu bunları yiyen hayvanlar ve insanlara geçmektedir (Kaymak, 2011). Şekil 1.1.' de pestisitlerin ekosistem üzerine etkileri verilmiştir.

Deltametrinin Türkiye'deki ruhsatlı ilaçları; Decis, Deltharin, Desinol, Depar, Dekagard, Deşarj ve Zodiac'dır (Cengiz, 2002).

1.2.1.5. Deltametrinin vücutta emilimi ve metabolizması

Deltametrine maruziyet en çok kirlenmiş yiyecek ve sudan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle oral yolla hızlıca emilirler (Barlow ve ark., 2001). Tarımda kullanımı artan deltametrin aynı zamanda uçakların dezenfekte edilmesi ve deltametrin ile emprenye edilmiş sivrisinek ağlarında kullanıldığından dolayı bu maddeye maruz kalma riski artmıştır (Janakara ve ark., 1995; Kumar ve ark., 2015).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada deltametrinin karaciğerdeki mikrozomal oksidaz enzimleri tarafından hızlı bir şekilde metabolize edildiği görülmüştür (He ve ark., 1991). Oral yolla alınan deltametrinin 2-4 gün sonra çoğu metabolitleri ve metabolize olmayanları vücuttan dışkı yolu ile atılırlar. Metabolite olan siyano grubu, önce tiosiyanide çevrilir ve vücuttan yavaş yavaş atılır. Ama mide ve deri yoluyla alınan deltametrinin, yaklaşık sekiz gün geçtikten sonra bile %20'sinin hala vücutta varlığına rastlanılmıştır (He ve ark., 1991; Myers, 1998).

Deltametrinin insanda nasıl metabolize olduğu ile ilgili bilgi çok kısıtlı olmakla birlikte üç erkek gönüllü üzerinde bu durum araştırılmıştır (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001). Bu gönüllü erkeklere radyoaktif ^{14}C ile işaretlenmiş deltametrin 3 mg'lık tek doz halinde oral yolla verilmiştir (World Health Organization, 1990; Bhunya ve Pati, 1990). Plazmada deltametrinin seviyesi 1-2 saat içerisinde en yüksek seviyeye ulaşmış ve deltametrinin plazmadaki yarı ömrünün 10-11,5 arasında olduğu tespit edilmiştir. Beş gün boyunca gözlem altında tutulan gönüllülerin, deltametrinin %10-26'sını dışkıyla, %50-51'ini idrarla attıkları belirlenmiştir. Büyük bir çoğunluğu atılmasına rağmen deltametrinin metaboliti olan 3-(2, 2-dibromovinil)-2, 2-dimetilsiklopropan karboksilik asit vücutta bulunmuştur. Ayrıca bu metabolit deltametrin kullanan işçilerde de görüldüğü tespit edilmiştir. Bu da aynı kemirgenlerde olduğu gibi ester bağının hidrolize olduğunu göstermiştir (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001).

Memelilerde karaciğerde biriken deltametrin ve metabolitlerinin (Cole ve ark., 1982; Anand ve ark., 2006) nörotoksisite (Husain ve ark., 1994), kan-damar hastalıkları (Forshaw ve Bradbury, 1983), karaciğer ve böbreklerde toksisitesi rapor edilmiştir (Chargui ve ark., 2012).

1.2.1.6. Deltametrinin akut toksik etkileri

Deltametrinin toksik etkilerini şu şekilde sıralayabiliriz;

- Tremor ve kıvranma
- El, yüz ve ekstremite kaslarında kasılmalar,
- Tükürük salgısında artış,
- Deride tahriş,
- Kilo kaybı,
- Solunum güçlüğü,

- Hiperaktivite.

Zehirlenme belirtileri ise;

- Deride kızarıklık,
- Uyuşma,
- Kaşınma ve karıncalanma,
- Duyu bozukluğu,
- Hapşırma ve burun akıntısı,
- Kasların fazla ve istemsiz bir şekilde kasılması,
- Baş dönmesi ve şiddetli baş ağrısı,
- Mide bulantısı ve iştahsızlık şeklinde görülebilir.

Deltametrin maruziyeti vücutta hangi yol ile gerçekleşirse, ona bağlı olarak akut toksik etkileri gözlemlenir. Farelere yağda ya da polietilen glikol içerisinde çözünmüş deltametrini ağız yoluyla aldıklarında LD_{50} değeri 1-34 mg/kg olarak rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 1991). Bir başka maruziyet yolu olarak dermal uygulamalar yapılmıştır. Sıçanlarda 800 mg/kg vücut ağırlığı, tavşanlarda ise 2000 mg/kg vücut ağırlığında polietlilen glikolde çözülen deltametrinin ölüme neden olmadığı gözlenmiştir. Fakat sıçan ve tavşanlarda motor koordinasyon bozuklukları, vücutta titreme, kramplar, hiperaktivite gibi bulgular gözlenmiştir (Zhang ve ark., 1991; Poonam ve ark., 2013).

1.2.1.7. Deltametrinin insanlardaki toksik etkileri

Deltametrinin akut toksik etkileri birkaç istisna dışında genellikle mesleki maruziyet sonucunda, zirai mücadele işçilerinde görülmektedir (Barlow ve ark., 2001). 13 yaşındaki bir kız çocuğunun intihar girişiminde, 5 g deltametrini oral yolla alması sonucu kaslarda kramp, bilinç kaybı, taşikardi ve göz bebeğinde daralma gibi yan etkiler gözlenmiştir (Barlow ve ark., 2001). Başka bir vakada, 23 yaşındaki genç 1.75 g deltametrin içmiş ve hiçbir nörolojik hasarının oluşmadığı gözlemlenmiştir (Barlow ve ark., 2001).

Deltametrine işleri gereği maruz kalan kişilerin rapor ettikleri sorunlar ise genellikle deride yanma, karıncalanma ve uyuşukluk şeklindedir. Karıncalanmanın, genellikle 48. saatin sonunda yok olduğu bildirilmiştir (Bhunya ve Pati, 1990; World Health Organization, 1990; Barlow ve ark., 2001).

1.2.1.8. Deltametrinin genotoksik etkileri

Deltametrin insanlar üzerindeki toksisitesinin yüksek olmamasından kaynaklı yoğun olarak kullanılan bir pestisittir. Fakat yapılan *in vivo* çalışmalarda deltametrinin mikronükleus oluşumuna, kromozom ve sperm anormalliklerine sebep olduğu bildirilmiştir (Eriksson ve Fredriksson, 1991; El-Gohary ve ark., 1999). Hayvan ve bitkilerin üzerine yapılan çalışmalarda bu bilgileri doğrular niteliğindedir. *Allium cepa* bitkisinin deltametrinin 20 mg/L dozuyla çimlendirilmesi sonucu mikronükleus ve kromozomal hasarda anlamlı bir artışa neden olduğu, mitotik indeksinin ise anlamlı azalmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kromozomal hasara neden olan deltametrin, eşit olmayan kromatin dağılımı, köprü ve ters kutuplaşma, yapışkan krozomozoma neden olmuştur (Kutluer, 2019). Hayvanlar üzerine yapılan çalışmada da deltametrinin zaman içerisinde farklı konsantrasyonlarda maruz kalan hayvanlarda, mikronüklus anomalilerinin paralel artışı gözlenmiş ve genotoksik etki olarak DNA'da zincir kırıkları görülmüştür (Avcı, 2013).

1.2.1.9. Deltametrinin hepatoksisite mekanizması

Birçok metabolitin birikim organı olan karaciğer, piretroid metabolizmasında da temel role sahiptir (Gacar, 2016). Deltametrinin metabolik yolağında başta sitokrom P450 monoksijenaz enzimi olmak üzere birçok ksenobiyotik metabolize edici enzim rol oynamaktadır (Catinot ve ark., 1989). Tek doz Sipermetrin (25g/kg) ve Fenvalerat (4.5 g/kg)'e maruz kalan sıçanlarda antioksidan enzimlerinden olan süperoksit dismutaz ve katalazın aktivitesini azalttığı, lipid peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca eritrositlerde glutatyon seviyesini de düşürmüşlerdir (Kale ve ark., 1999). Deltametrinin intoksikasyonu serbest radikal oluşumuna (Mandal ve ark., 2005), karaciğerde sitokrom P450 ve oksidatif yolla hidroliz ester bağlarının ayrılmasına (Gacar, 2016), karaciğer dışında böbrek ve akciğerde de histolojik değişikliklere neden olmaktadır (Mandal ve ark., 2005; Shona ve ark., 2010). Ayrıca karaciğerde histolojik değişikliklerin yanında, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzimlerinde artışa ve karaciğerin enzimatik aktivitesinin olumsuz şekilde etkilenmesine neden olmaktadır (Gacar, 2016).

1.2.2. Neonikotinoid grubu insektisitler

1.2.2.1. Neonikotinoidlerin genel özellikleri

Neonikotinoid grubu pestisitler, Kaliforniya'daki bir araştırma merkezinde 1970'li yıllarda, kurşun bileşikleri üzerine yapılan bir çalışmada tesadüfen bulunmuştur. Bu grup pestisitlerden ilk sentezi yapılan nitiazindir (Kollmeyer ve ark., 1999).

En yeni insektisit sınıfı olan neonikotinoidler, sistemik etkiye sahiptir. En yaygın kullanılan çeşitleri asetamiprid, klotiyanid, dinotefuran, imidakloprid, nitenpiram, nitiazin, tiyakloprid ve tiyametoksamdır (Tomizawa ve ark., 2005). Böceklerde nikotin benzeri uyarıcı etki gösterirler. MSS'deki nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanırlar. Bu bağlanma geri dönüşümsüz ve sıkı şekilde gerçekleşir. Bu nedenle böceklerdeki toksik etkileri diğer canlılara göre daha şiddetli gerçekleşir (Matsuda ve ark., 2001).

Türkiye'de ruhsatlı olarak satışı yapılan asetamiprid, klotiyanid, imidakloprid, tiametoksam ve tiyakloprid gibi neonikotinoid türlerinin Avrupa Birliği'ndeki ilgili kurum ve kuruluşlar, sivil toplum örgütleri ve arı üreticiliği tarafından zehirli oldukları belirlenmiş ve arı kolonilerini de öldürdükleri tespit edildiği için yasaklanması gerektiği belirtilmiştir (Kaya, 2019). Bu bilgiler üzerine gerekli araştırmalar yapılarak 19.12.2018 tarihinde Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından, neonikotinoid grubu aktif maddelerin bir kısmının yasaklanması ve kısıtlanması gerektiğine karar verilmiştir (Ek 1) (Kaya, 2019).

Neonikotinoidler, N-nitroguanidinler, nitrometilenler ve N-siyanoamidinler olmak üzere üç kimyasal grupta sınıflandırılabilirler (Nauen ve Jeschke, 2011). Neonikotinoidler, suda çözünür ve bu nedenle bitkiler tarafından kökleri veya yapraklarıyla kolayca emilim sağlarlar. Haşere kontrolünde, bitkinin tüm kısımlarını korudukları için bitkiye birçok avantaj sağlarlar (Nauen ve Jeschke, 2011).

1.2.2.2. Neonikotinoidlerin toksik etki mekanizmaları

Neonikotinoidler, nikotinden oluşan bileşiklerdir. Bu grupta bulunan asetamiprid maddesi, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin agonisti olarak etki gösterir. Böcek ve memelilerde farklı etkileri olan bu grup pestisitler, böceklere göre memelilerde daha düşük toksisitesi olan maddelerdir. Ancak neonikotinoid içeren böcek öldürücüler üzerinde yapılan bir çalışmada, omurgalıların nikotinik reseptörlerini aktive edebilmeleri veya modüle edebilmelerinden dolayı insanlar üzerinde daha güçlü yan etkilerinin olabileceği bildirilmiştir (Li ve ark., 2011).

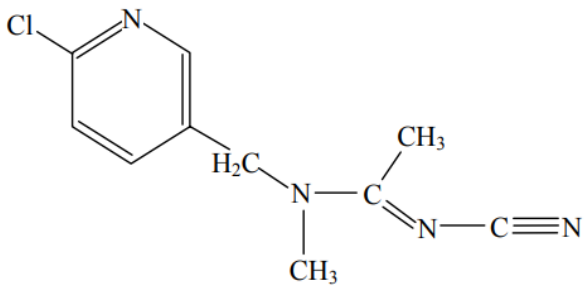
Nikotinik asetilkolin reseptörü agonistleri, MSS'te bulunan nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR'lere) kuvvetli bir şekilde bağlanırlar (Tomizawa ve Casida, 2005). Asetilkolin etkisini taklit ederek iyon kanallarının açılmasına ve sodyum, potasyum gibi katyonların hücre içine girmesine neden olurlar (Rose, 2012; Anderson ve ark., 2015). Aynı zamanda nAChR agonisti olarak voltaj kapılı kalsiyum kanalları aracılığıyla da etki gösterirler (Simon-Delso ve ark., 2015).

1.2.2.3. Neonikotinoidlerin biyolojik metabolizması

Neonikotinoid biyotransformasyonlarında en önemli enzimler, karaciğer mikrozomal CYP450'ler ve sitozolik aldehit oksidazlardır (AOX) (Honda ve ark., 2006). Bal arıları üzerinde yapılan bir çalışmada asetamiprid maddesinin farklı vücut kısımlarında farklı hızlarda dağıldığını ve hızlıca yedi metabolite (IM 0, IM 2-1, IC 0, IM 1-3, U1, U2 ve IM 1-4) parçalandığı bildirilmiştir. Metabolitlerin tüm vücut kısımlarında bulunması asetamiprid detoksifikasyonunun sadece bağırsakta değil tüm organlarda gerçekleştiğini göstermiştir (Brunet ve ark., 2005). Fakat asetamipridin insanlardaki metabolizmasına ait çalışmalar henüz bulunmamaktadır.

1.2.2.4. Asetamipridin genel özellikleri

Neonikotinoidler arasında dünyada en çok kullanılan bileşiklerden birisidir (Badawy ve ark., 2019). Başka bir neonikotinoid olan imidakloprid'in yapısına 6-kloro-3-piridilmetil grubunun ilave edilmesiyle meydana gelmiştir (Sheets, 2010). Ticari adları; Mosetam, Mospilan, Malcon, Hekplan, Akira, Neoplan ve Mostar'dır. Kimyasal adı ise (E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl) methyl]-N2 -cyano-N1 – methylacetamidine'dir.



Şekil 1.7. Asetamipridin kimyasal yapısı (Yavuz, 2007)

Nippon Soda firması tarafından 1995 yılında piyasaya çıkarılmıştır (Thompson ve ark., 2020). Kloropiridinil yapısı içeren birinci kuşak neonikotinoid olan asetamiprid

(Rose, 2012), farmakofor grupları ele alındığında *N*-siyano-guanidinler sınıfında yer almaktadır (Nauen ve Jeschke, 2011).

Nitro grubu içeren neonikotinoid kullanımına, tozlaştırıcılar üzerinde toksik etkileri gözlenmesinden dolayı Avrupa Birliği tarafından kısıtlama getirilmiştir. Bunun sonucunda da siyano grubu neonikotinoidlere ilgi artmıştır. Genellikle yapraklara sprey yoluyla uygulanan asetamiprid, tohum kaplamada da kullanılmaktadır (Camp ve ark., 2020). Ek olarak, termitlerin ve ev haşerelerin kontrolü için, toprak, pamuk, sebze, patates, morina güvesi kontrolü için meyve bahçelerinde, asmalar, çay ve süs bitkilerinde de kullanılmaktadır (Nauen ve Jeschke, 2011).

1.2.2.5. Asetamipridin vücutta emilimi ve metabolizması

Gıdalar yoluyla maruz kalınan asetamiprid, hızla ve yüksek oranda bağırsaklarda absorbe edilir (Simon-Delso ve ark., 2015). ^{14}C ile işaretlenmiş asetamiprid, dişi ve erkek sıçanlarda kan dolaşımı ile kan- beyin ve kan- testis bariyerlerini geçerek, dalak, kalp, kemik, akciğer, karaciğer, beyin, böbrek, yağ dokusu ve testislere dağıldı yapılan bir çalışmada gözlenmiştir (Ford ve Casida, 2006a; Ford ve Casida, 2006b; Marfo ve ark., 2015).

Neonikotinoid metabolizması, omurgalılarda indirgeme, demetilasyon, hidroksilasyon ve olefin gibi reaksiyonlar ile gerçekleşir. Kloropiridinil yapısı içeren asetamiprid, 6-kloronikotinik asite parçalanır. Bu metabolitlerinde insan ve farelerde glisin veya glukronik asit konjugatları halinde idrar ile uzaklaştırılır (Thompson ve ark., 2020). Ayrıca asetamipridin, metabolize edildikten sonra dışkı yoluyla da atıldığı bilinmektedir (Terayama ve ark., 2018). Sağlıklı yetişkinlerde yapılan bir çalışmada, asetamipridin %3 oranında değişmeden vücuttan atılabildiği ve %31'nin daha yavaş elimine edilen desmetil-asetamiprid haline dönüştürüldüğü bildirilmiştir (Thompson ve ark., 2020).

1.2.2.6. Asetamipridin akut toksik etkileri

Asetamipride inhalasyon yoluyla maruz kalınması durumunda baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma gibi belirtiler gözlenmiştir (Chakroun ve ark., 2016). Asetamiprid ile intihar vakalarında ise kas güçsüzlüğü, hipotermi, konvülsiyonlar, taşikardi, hipotansiyon, elektrokardiyogram değişiklikleri ve susuzluk gibi belirtiler gözlemlenmiş. Şiddetli vakaların ise ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (Imamura ve ark., 2010).

1.2.2.7. Asetamipridin insanlardaki toksik etkileri

Çin'de neonikotinoid düzeylerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 386 yetişkinin idrar numunesi araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda 10 neonikotinoid türevi arasında en yüksek düzeyde asetamiprid (ortalama 49,43 mg/g kreatinin) varlığına rastlanılmıştır (Zhou ve ark., 2021).

Subkronik asetamiprid maruziyetinin immün sistem üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, maruziyet sonrası immün parametrelerinde değişmeler gözlenmiştir. Kurkuminin ile iyileşmenin incelendiği bu çalışmada, Swiss albino farelerde 61 gün boyunca asetamiprid (5mg/kg; oral) ve kurkumin (100 mg/kg; oral) tek başlarına ve kombine halde uygulanmıştır. Serum anti-rCFP32 antikor düzeyleriyle relatif vücut ve organ (dalak) ağırlıkları incelenmiş, ayrıca lenfosit proliferasyon testi uygulanmış ve histopatolojik incelemeler yapılmıştır. Tüm bu incelemeler sonucunda, asetamiprid maruziyetinin anlamlı düzeyde immün sistemi baskıladığı, kurkumin ile birlikte kullanıldıklarında ise asetamiprid toksisitesinin kısmen azaldığı gözlenmiştir (Marzouki ve ark., 2017).

Asetamiprid ve kurkuminin nörotoksisiteye etkilerini araştıran bir başka çalışmada, Wistar sıçanları 21 gün boyunca asetamiprid (40mg/kg; oral) ve kurkumine (100 mg/kg; oral) tek başlarına ve kombine şekilde maruz bırakılmıştır. Söz konusu çalışmada davranış testleri (eğik düzlem testi, ön pençe kavrama zamanı testi) yapılmış ve kolinesteraz aktivitesi, oksidatif stres parametreleri (malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (*SOD*), katalaz (*CAT*), tiyol düzeyleri), hücre canlılığı, histopatolojik değişiklikler ve apoptoz/nekroz oranı araştırılmıştır. Araştırma bulgularına göre, nörodavranışsal testlerde asetamiprid tarafından gelişen toksisiteyi kurkumin uygulamasının azaltıldığı gözlenmiştir. Yine kurkuminin oksidatif stres parametrelerini (MDA, *SOD* ve *CAT* düzeyleri), hücre canlılığını ve hücre içi Ca^{+2} düzeylerini iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Dhouib ve ark., 2017).

1.2.2.8. Asetamipridin genotoksik etkileri

Asetamiprid ile yapılan çalışmada insan periferal lenfosit hücrelerinde mikronükleus (MN) ve kardeş kromatit değişimi (KKD) frekanslarında önemli bir artış meydana gelmiştir (Kızılet ve Uysal, 2018). Asetamipridin genotoksisite ile ilgili yapılan diğer

çalışmalara bakıldığında, asetamipridin *in vivo* olarak genotoksik olma özelliği düşük bulunmuştur (Hernandez Jerez ve ark., 2022).

1.3. Oksidatif Stres Ajanları

1.3.1. Serbest radikaller

Dış orbitallerinde tek sayıda paylaşılmamış elektronu olan molekül veya atomlara serbest radikal denir (Valko ve ark., 2004). Kısa ömürlü ve reaktif olan bu serbest radikaller, pozitif, negatif ve nötral yüke sahip olabilirler. Yüksek enerjiye sahip olan elektronlar, çevrelerindeki diğer elektronları ayırıp yapılarını bozduklarında serbest radikaller tehlikeli olur (Uysal, 1998). Besinlerin oksijeni kullanarak enerjiye dönüştükleri zaman meydana gelen serbest radikaller, kararsız yapıya sahiptirler (Ören, 2009).

Tüm hücrelerde oldukça fazla kullanılan ve hücrelere kolayca giren oksijen molekülü, aerobik metabolizmaya sahip canlılar için en önemli serbest radikal kaynaklarındandır. Moleküler oksijenin (O_2) iki eşleşmemiş elektronu paralel spin durumundadır. Oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girip, serbest radikallerle kolay reaksiyona giriyorsa biradikal (diradikal) olarak adlandırılır. Moleküler oksijen, biradikal olmasının sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturur (Akkuş, 1995). Genel olarak serbest radikaller kovalent bağların bölünmesiyle, molekülün elektron kaybetmesiyle ve moleküler elektron eklenmesi ile olmak üzere üç farklı yolla oluşabilirler (Wu ve Cederbaum, 2003).

1.3.1.1. Kovalent bağların bölünmesiyle oluşan serbest radikaller

Homolitik bölünmeye uğrayan kovalent bağlardan sonra molekülün her parçasında ortak elektronlardan birinin kalması ile gerçekleşir (Gacar, 2016).

1.3.1.2. Molekülün elektron kaybetmesiyle oluşan serbest radikaller

Radikal özelliğe sahip olmayan molekülün elektron kaybettiği zaman dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalarak radikal hale gelmesiyle gerçekleşir (Gacar, 2016).

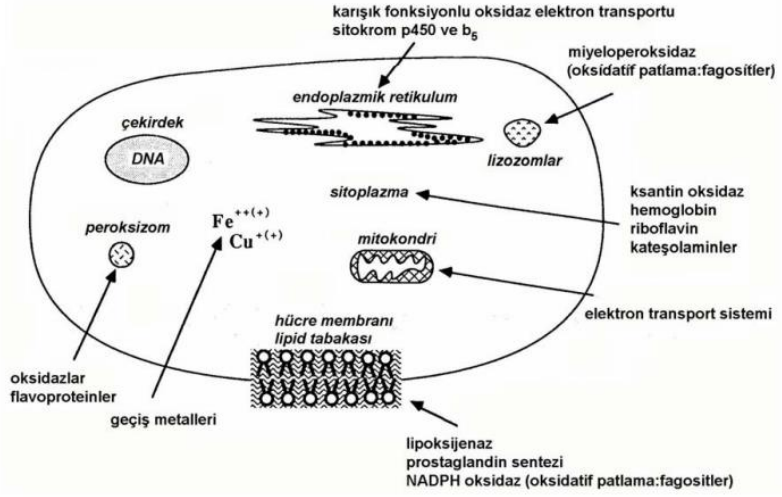
1.3.1.3. Moleküle elektron eklenmesiyle oluşan serbest radikaller

Radikal özelliğe sahip olmayan molekülün tek elektron transferi yaparak dış orbitalinde eşleşmemiş elektron içeren radikal forma dönüşerek gerçekleşir (Gacar, 2016).

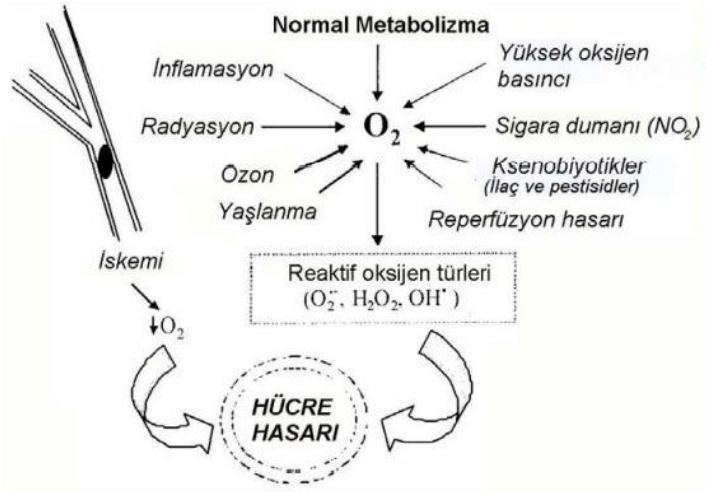
Hücrelerimizin içerisinde çeşitli miktarlarda radikal üretimi gerçekleşir (Gacar, 2016). Bu serbest radikaller kaynakları Tablo 1.4.'de özetlendiği üzere endojen ve eksojenler olarak iki temel gruba ayrılmıştır.

Tablo 1.4. Radikal Kaynakları (Gacar, 2016).

A. Endojen Kaynaklar	**B. Eksojen Kaynaklar**
• Peroksizomlardaki enzimler (Oksidazlar, flavoproteinler)	• Metal iyonları
• Sitokrom p-450	• Radyasyon
• Elektron Transport Sistemleri	• Aktifleşmiş fagositler
• Proteinler ve enzimler (Ksantin oksidaz, hemoglobin, triptofan dehidrojenaz, adenozin deaminaz)	• Antineoplastik ajanlar (Sisplatin, doksorubisin, metotreksat vs.)
• İskemi, travma, intoksikasyon sonucunda gerçekleşen oksidatif strest	• Bağımlılık yapan maddeler
• Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler ve hidrokinonların otooksidasyonu	• Stres
• Antibiyotikler (Geçiş metallerine afinitesi olanlar)	• Ksenobiyotikler (hiperoksi, hava kirliliği, pestisitler, solventler, aromatik hidrokarbonlar)
• NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz içeren plazma membran enzimleri ve lipid peroksidasyonu (Kaya, 2005; Cüre, 2007).	• Katkı maddeleri



Şekil 1.8. Endojen serbest radikal kaynakları

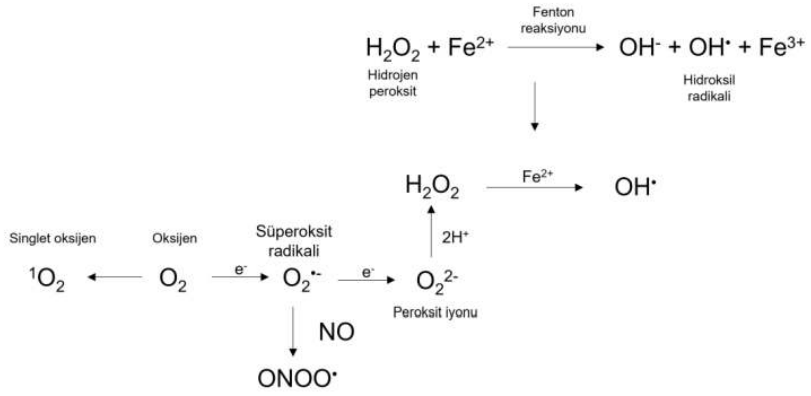


Şekil 1.9. Eksojen serbest radikal kaynakları (Özden, 2006)

Ksenobiyotikler ve biyoaktivasyonları sonucu oluşan ürünler, organizmadaki serbest radikal ve ROS oluşumunun ana kaynaklarındandır. Birçok madde serbest radikal oluşturarak hücreleri oksidatif strese sokabilirler. Oksidatif strese neden olan ksenobiyotikler arasında önemli olan madde gruplarından biri de pestisitlerdir. Pestisitlerin neden oldukları toksik etkiler sonucu serbest radikaller oluşmaktadır (Mercan, 2004).

1.3.2. Reaktif oksijen türleri

Normal hücresel metabolizma ürünü olan reaktif oksijen türleri, canlılarda hem zararlı hem de yararlı etkileri vardır. Yarar sağlayan etkileri genellikle düşük veya orta konsantrasyonlarda meydana gelmektedir. Bu etkiler arasında; patojenlere karşı savunma, vasküler tonun düzenlenmesi, eritropoetin üretiminin kontrolü, ventilasyon, bazı fizyolojik süreçlerde membran reseptörlerinden sinyal iletimini alması ve mitojenik cevabı indüklemesi gibi etkileri vardır. Zararlı etkilerinde ise; ROS/reaktif nitrojen türleri (RNT)'nin aşırı üretilmesidir. Enzimatik ya da non-enzimatik antioksidanların yetersizliğe bağlı olarak gelişen bu üretim, hücresel lipidlere, proteinlere veya DNA'ya zarar vererek işlevlerini bozar (Dröge, 2002; Valko ve ark., 2007).



Şekil 1.10. Bazı reaktif oksijen türleri (Mittler, 2017)

ROS serbest radikalleri içerdiği gibi serbest radikal olmayan oksijenli molekülleri (hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1/2 O_2) ve hidroksil radikali (OH)) içerir. Bu serbest radikal olmayan aktifleşmiş oksijen türleri reaktiftir ve organlarda toksik etkilere yol açmaktadırlar. Süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alarak ya da moleküler oksijenin çevresindeki iki elektronu alarak peroksit oluşur. Peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesiyle de hidrojen peroksit meydana gelir (Kohen ve Nyska, 2002).

Biyolojik sistemlerde ise süperoksitin ($O_2^{\bullet-}$) dismutasyonu ile hidrojen peroksit üretilir. Bu reaksiyonda iki tane süperoksit molekülü iki proton alır ve bu sayede hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşur. Antioksidan savunma sistemlerimden olan süperoksit dismutaz (*SOD*) enzimi, bu reaksiyonu katalizler ya da spontan bir şekilde de gerçekleşebilir (Miao ve Clair, 2009).

Aslında serbest radikal olmayan hidrojen peroksit, ROS kapsamına girer ve serbest radikallerin oluşmasında önemli bir görevi vardır. Bunun nedeni, geçiş metallerinin (Fe+2, Cu+) varlığında Fenton reaksiyonu ile ve süperoksit radikallerinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalini (OH) oluşturmasındandır. OH radikalinin en önemli özelliği, DNA, proteinler, lipitler, aminoasitler, glikoz ve metallerle etkileşime giren en güçlü oksitleyici radikali olmasıdır (Young, 2001; Al-Omar ve ark., 2004).

Fenton Reaksiyonu

$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^* + OH- + Fe^{+3}$

Haber-Weiss Reaksiyonu

$O_2- + H_2O_2 \rightarrow OH^* + OH- + O_2$

Süperoksit Radikali (O_2^-), oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi ile meydana gelir. İndirgenen geçiş metallerinin otooksidasyonunda da meydana gelebilir. Yüksek derecede reaktif olmayan süperoksit radikali, direkt olarak bir zararı yoktur. Bu radikalin önemli olmasının nedeni, hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metallerinin indirgeyicisi olmasıdır. Çoğunlukla mitokondride oluşur ve mitokondrideki enerji dönüşümü sırasında meydana gelen elektron kaçakları oksijenin O_2^- 'lerine dönüşümüne neden olur (Valko ve ark., 2004).

1.3.3. Oksidatif stres

Hücrelerin lipid tabakasında peroksidasyona sebep olan serbest radikallerin üretilmesiyle vücudun antioksidan savunma sistemleri arasında var olan dengenin bozulmasına oksidatif stres denir (Abdollahi ve ark., 2003). Bir başka ifadeyle, reaktif oksijen türlerinin ve onlarla etkileşim halinde olan antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasına da denir (Sies ve Cadenas, 1985). ROS'da gerçekleşen artış hücre için toksiktir ve proteinleri, lipidleri, nükleik asitleri hasara uğratır. Bu hasar hücrenin sinyal yolaklarını bozar (López-Alarcón ve Denicola, 2013). Oksidatif stres Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalıkları ve amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif durumlar, kanser, amfizem, yaşlanma diyabet, inflamatuar hastalıklar gibi pek çok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Valko ve ark., 2007; Pisoschi ve Pop, 2015).

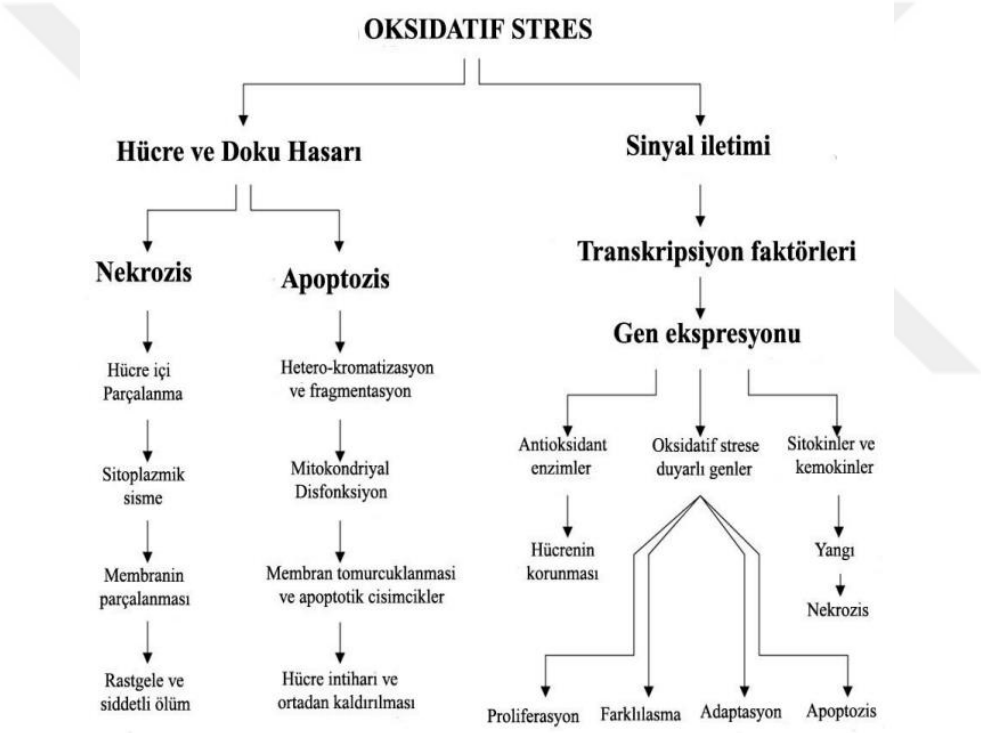
Oksidatif stres sonucunda çeşitli reaksiyonlar ve bozukluklar meydana gelmektedir. Bunlardan bazıları;

a) Adaptasyon: Antioksidan savunma sistemleri sonradan kendilerini tekrar düzenleyebilirler. Mesela bir ortamdaki O_2 miktarının giderek artan miktarlarda verilmesi sıçanlarda antioksidan savunma enzimlerinin ve akciğerdeki GSH miktarında artış gözlenmiştir. Bu artış nedeniyle düşük O_2 seviyesindeki ortamda yani kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha dirençli hale geldikleri gözlenmiştir (Halliwell, 1990).

b) Doku Hasarı: Oksidatif stres sonucu hasara uğrayan dokunun hedef alındığı primer hücreler de farklılık gösterir. Örnek olarak, memelilerin birçok hücresinde lipit peroksidasyonu ya da oksidatif protein hasarı gözlemlenmeden önce DNA ipliklerinde kırılmalar meydana gelmiştir. Bu kırılmaların nedeni geçiş metal iyonları

ile H_2O_2'nin reaksiyona girmesi sonucu OH'ya dönüşmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Halliwell, 1990).

c) Hücre Ölümü: Hücre ölüm mekanizmaları genellikle nekroz ve apoptoz olarak iki temel grupta meydana gelmektedir. Bu iki ölüm mekanizması oksidatif stres sonucu meydana gelebilir. Nekroz, nekrotik hücrenin şişip patlar ve sitoplazmasını çevreye yayarak etrafındaki hücreleri etkiler. Sitoplazma içerisinde katalaz veya GSH gibi antioksidan savunma enzimlerinden biri varsa, nekrotik hücrenin ölümü sonucunda civardaki hücrelere de oksidatif stres yayılır. Apoptoziste ise hücrenin içsel ölümü söz konusudur. Bu sebeple sitoplazmanın içeriği dışarı salınmaz ve çevre hücrelerde hasara neden olmaz (Halliwell, 1990).



Şekil 1.11. Oksidatif stres sonucunda organizmada meydana gelebilecek reaksiyonların özeti (Haddad, 2002)

Çevrede kalıntıları uzun süreler kalabilen ve biyolojik sistemleri olumsuz etkilediği bilinen pestisitlerin toksik potansiyelleri yoğun olarak çalışılmış ve pestisit kaynaklı oksidatif stres de toksikolojik araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Karabıyık, 2019). Pestisitler ve oksidatif stres oluşumu açısından birçok çalışma olsa da kan dahil olmak üzere farklı dokularda, farklı maruz kalma dozlarında, farklı organizmalarda ve farklı koşullarda incelemeler yapılmıştır. Deney hayvanları ile ilgili John ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmalarda antioksidan savunma sistemlerindeki

enzimlerin, pestisit maruziyeti sonrası değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda antioksidan enzimlerinin aktivitesinin arttığı veya azaldığına yönelik teoriler tartışmalara sebep olmuşlardır. Eğer aktivite arttıysa, pestisitler oksidatif stresi gidermek amacıyla serbest radikalleri temizleyen enzimlerin indüklenmesine sebep olan mekanizmanın bir aktivasyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Eğer antioksidan enzimlerinde bir azalma meydana gelmişse, pestisit metabolizması sırasında, oksidatif moleküllerin bağlanmasından kaynaklanan enzimlerin dolaylı olarak inhibisyona uğradıkları düşünülmüştür (Karabıyık, 2019).

1.3.4. Antioksidan savunma sistemleri

Hücrede bulunan lipit, protein ve DNA gibi maddelerin serbest radikaller tarafından okside olmalarını engelleyen sistemlere antioksidan savunma sistemleri denir (Aslankoç ve ark., 2019). Antioksidanlar, serbest radikallere ihtiyaçları olan elektronun transferini yaparak hücresel düzeyde gerçekleşebilecek hasarı önlemektedir. Dört farklı mekanizması vardır.

1) Temizleme: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek, daha zayıf moleküle dönüştürmeyi ve bu sayede etkisiz hale getirmeyi amaçlamaktadır.
2) Baskılama: Vitaminler ve flavonoidlerin etkilerini gösterdikleri bu yol, oksidanlara bir hidrojen aktararak onları etkisiz hale getirmeyi ya da reaksiyon hızlarını azaltmayı amaçlar.
3) Onarım: Lipit, protein ve DNA gibi yapıların, serbest radikaller tarafından meydana gelen biyolojik hasarlarının onarılmasıdır.
4) Zincir Koparma: Serbest oksijen radikallerini bağlar ve bu sayede bağlanan zincirleri kırıp işlevlerinin engellenmesini amaçlanmaktadır (Valko ve ark., 2007).

Antioksidan maddeler ikiye ayrılırlar. Bunlar;

a) Enzimatik Olmayan: Yiyeceklerle aldığımız gruptur. A, E ve C vitaminleri, fenolik maddeler ve flavonoidler bu gruptadırlar.
b) Enzimatik Olan: Hücresel düzeyde üretilen, birincil basamak antioksidanlardır. Katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon bu gruba girerler (Aslankoç ve ark., 2019).

1.3.4.1. Enzimatik antioksidan maddeler

1.3.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD):

ROS ve süperoksit anyon radikallerine karşı en önemli antioksidan enzimlerindendir. Süperoksit radikalini O_2 molekülüne yükseltir ve başka bir süperoksit radikalini ise daha az reaktif olan hidrojen perokside molekülüne indirgenmesini katalizler (Aslankoç ve ark., 2019). Ayrıca *SOD*, lipit peroksidasyonunu inhibe eden bir metalloenzimdir (McCord ve Fridovich, 1988).

Süperoksit dismutazlar, aktif bölgelerinde bakır, çinko, manganez, demir ve nikel kullanan proteinlerdir ve merkezlerindeki bu geçiş metallerine göre üç sınıfa ayrılırlar (Fridovich, 2001). Cu/Zn-*SOD* (*SOD 1*), hem bakıra hem de çinkoya bağlanır. Mn-*SOD* (*SOD 2*) ve Fe-*SOD* (*SOD 3*) ise, demire ya da manganeze bağlanırlar (Gacar, 2016).

1.3.4.1.1.1. SOD1:

132 kDa ağırlığında olan insan *SOD1* proteini, sitoplazmada, nükleer bölmelerde ve lizozomda bulunur (Aslankoç, 2019). İnsan genomunda 21. kromozom üzerinde yer almaktadır (Gacar, 2016). Down sendromu, Amniyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalıklarında rol oynar (Aslankoç, 2019).

1.3.4.1.1.2. SOD2:

23 kDa ağırlığında olan protein, aerobik hücrelerin mitokondrisinde bulunur. Hücre farklılaşması, tümorogenez ve pulmoner toksisite ile uyarılan hipokside büyük bir rolü vardır. Gen mutasyonlarında nadir görülen ailesel motor nöron hastalıkları, idiyopatik kardiyomiyopati ve erken yaşlanma ile ilişkilendirilen bir proteindir (Takada ve ark., 2002; Zelko ve ark., 2003).

1.3.4.1.1.3. SOD 3:

En son tespit edilen *SOD3*, 135 kDa ağırlığındadır. Plazmada, lenfte, sinoviyal sıvıda ve özellikle damar çeperlerinde bulunur. Vasküler düz kas hücrelerinde oldukça fazla sentezlendiği bildirilmiştir. Ayrıca heparine karşı yüksek afinitesi bilinmektedir. Bu nedenle heparin ve heparan sülfat protein kinaz C aracılı mekanizma ile *SOD3*'ün ekspresyonu düzenlenebilir (Aslankoç, 2019). Ekstraselüler süperoksit dismutaz (EC-*SOD*) olarak da adlandırılırlar. Ekstraselüler boşlukta süperoksit radikallerini temizleyen tek enzimdir. Bu nedenle redoks döngüsünün vazgeçilmez enzimidir. Bunun dışında birçok dokuda ifade edildiği bilinse de en fazla arterlerde ve akciğerde bulunurlar (Zelko ve ark., 2002).

1.3.4.1.2. Katalaz (CAT):

Temel yeri peroksizomlar olan katalaz enzimi, memeli hücrelerin mitokondrilerinde bulunmaz. Tek istisna olan durumu ise sıçanların kalbinde bulunan mitokondridir (Ighodaro ve Akinloye, 2018). H_2O_2'nin suya indirgenerek tüketilmesinde rol oynamaktadır. Karaciğer hücrelerinde ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda ifade edilir (Pisoschi ve Pop, 2015). Tüm enzimler içerisinde en büyük reaksiyon hızına sahiptir. Dakikada 6 milyon H_2O_2 molekülünü su ve oksijene dönüştürebilir (Göktaş, 2007).

Katalaz reaksiyonu iki ana basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamakta, hidrojen peroksidin enzime bağlanması sonucu oluşan kompleks-I ara ürünü meydana gelir. Kompleks-I'in ikinci hidrojen peroksit molekülüyle reaksiyona girdiğinde su ve moleküler oksijen oluşur. Eğer metanol ve etanol gibi hidrojen veren, kompleks-I ile reaksiyona girerse su ve bir aldehit ürünü oluşur (Kaya, 2005).

H_2O_2'nin düşük konsantrasyonda olduğu durumlarda hidrojen peroksidi substrat olarak kullanacak olan diğer antioksidan enzimler devreye girer. Bu sayede hidrojen peroksit ortamdan uzaklaşmış olur. Bu sonuç doğrultusunda katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki konumları ve etki yerleri farklıdır. Katalaz peroksizomlarda bulunurken, glutatyon peroksidaz enzimi sitozol ve mitokondride bulunur (Cüre, 2007).

1.3.4.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPx):

Mitokondri ve sitozolde, hidrojen peroksidi suya parçalayan önemli antioksidandır (Fattman ve ark., 2003). Aktivitesi selenyuma bağlı olan glutatyon peroksidaz ve selenyuma bağlı olmayan glutatyon peroksidaz olarak ikiye ayırmak mümkündür. Genellikle glutatyon peroksidaz, selenyuma bağlıdır. Önemli rollerinden biri, hücreyi oksidatif strese karşı korumasıdır (Cnubben ve ark., 2001). Oksidatif sırasında askorbat peroksidazları inhibe ederler. Daha sonra, H_2O_2 süpürücü olarak görev yapar. H_2O_2 ve hidroperoksitlerin suya ya da alkollere indirgenmesini katalize eder. Bu kataliz sonucu diğer organik hidroperoksitlerin detoksifiye eder (Su ve ark., 2019).

Farklı dokulara özgü olan ve farklı hücre konumlarına sahip 8 tane izoenzimi vardır. Glutatyon peroksidaz 1 (GSH-Px 1), en sık bulunan izoenzimdir (Gacar, 2016). Hemen hemen her dokuda bulunan GPx1, selenyum bağımlıdır (Aslankoç ve ark., 2019). GSH-Px 2 izoenzimi, ekstraselüler ve intestinal bir enzimdir. GSH-Px 3, ekstraselüler ve

özellikle de plazmada çok bulunan bir izoenzimdir. GSH-Px 4 ise, daha düşük seviyelerde memeli hücrelerinde salgılanır. Özellikle substrat olarak lipit peroksiti tercih eder (Muller ve ark., 2007). Ayrıca oksidatif strese karşı apoptotik bir tepkiye aracılık yapar (Sanyal ve ark., 2009). GPx 5 ve GPx 6 izoenzimleri selenyum içermezler ama GPx 6 insan gen araştırmalarında selenoprotein olarak tanımlanmaktadır. GPx 7 ve GPx 8 de selenyum içermezler ve hidrojen peroksiti temizlerler. Yapılan çalışmalar ile GPx seviyelerinin herhangi birinde bir azalma sonucunda antioksidan savunma sisteminde bir bozulma meydana geldiği bildirilmiştir (Chabory ve ark., 2009).

1.3.4.2. Enzimatik olmayan antioksidan maddeler

1.3.4.2.1. Glutatyon (GSH):

Pek çok organizmada özellikle de insan karaciğerinde bulunan GSH, glutamik asid, sistein ve glisinden, γ-glutamil sistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimleri aracılığıyla oluşan bir tripeptittir (Piner, 2009). GSH, çok sayıda redoks reaksiyonuna girer ve yüksek oranda O2 •- veya OH• radikalleri ile oksitlenir. Hücredeki yoğunluğundan dolayı çöpçü veya kurbanlık nükleofil olarak hizmet etmektedir. Bu nedenle hassas hücresel bileşenlerin aşırı oksidasyonunu önleyen kimyasal bir engeldir (Noctor ve ark., 2011). Sitozol (1-11mM), çekirdek (3-15 mM) ve mitokondride (5-11mM) bolca bulundukları için buraların çözünür antioksidanlarındandır (Valko ve ark., 2007).

Redükte glutatyon ve okside glutatyon (GSSG) olarak ikiye ayrılır. Önemli bir antioksidan olan glutatyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürür. Bu sayede hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların toksik etkilerinden korumuş olur. GSH, serbest sülfidril yapısına sahiptir ve hücre içi sülfidril tamponu olarak işlev görür. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır (Yemişen, 2008).

1.3.4.2.2. Tiyoredoksin (Trx):

NADPH, tiyoredoksin redüktaz (TrxR) ve Trx ’ten oluşan tiyoredoksin, aktif bölgesindeki disülfitin NADPH’ye bağlı indirgenmesini kataliz eder. NADPH ise *CAT* enzimini aktif tutarak Trx ile glutatyon redüktaz tarafından kofaktör olarak kullanılır. GSH sistemleri ile birbirlerini tamamlarlar (Su ve ark., 2019).

1.3.4.2.3. Flavonoidler:

Bitkilerde bulunan flavonoidler, ROT'un doğrudan kaldırılmasını, antioksidan enzimlerinin aktivasyonunu, metal şelasyon aktivitesi, α- tokoferil radikallerinin indirgenmesi ve oksidazların inhibisyonu gibi birçok yolla antioksidan aktivite göstermektedir (Prochazkova ve ark., 2011).

1.3.4.2.4. Çinko:

SOD'un bileşenidir. NADPH-oksidazı inhibe eder ve metallotiyoneinlerin sentezini indükler (Su ve ark., 2019).

1.3.4.2.5. Melatonin:

SOD, CAT ve GPx enzimlerin aktivitesini arttırarak oksidatif strese karşı savunma sağlar (Rodriguez ve ark., 2004).

1.3.4.2.6. Koenzim Q10:

Mitokondriyal solunumda elektron taşınması için gerekli olan tek lipofilik antioksidandır (Littarru ve Tiano, 2007).

1.3.4.2.7. Selenyum:

GPx ve TrxR gibi pek çok protein için kofaktör görevi vardır. Küçük molekül ağırlığına sahip olan antioksidanlar arasındadır (Nordberg ve Arner, 2001).

1.3.4.2.8. Metallotiyoneinler:

Sülfidril (-SH) grubu içerdiklerinden dolayı reaktif türlere karşı korumada önemli yerleri vardır. Transferrin, ferritin ve laktoferrin gibi metal bağlayıcı proteinleri kapsar. Bu proteinler redoks aktif demirin (Fe^{+2}) şelatörlerindendir (Mironczuk-Chodakowska ve ark., 2018).

1.3.5. Apoptoz

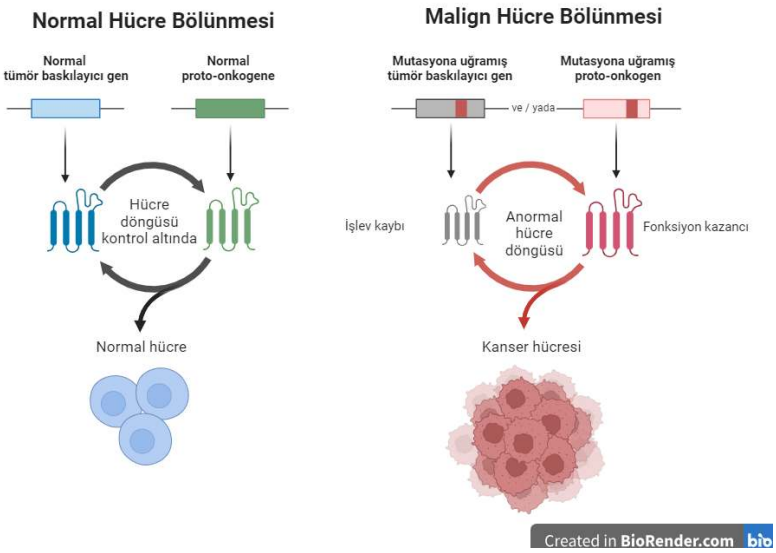
Oksidatif stres çoğunlukla mitokondriyal seviyede oluşur. Bunun nedeni, mitokondrinin elektron taşıma zincirleriyle yakın olması ve koruyucu bir histon yapıları olmadığındandır. Böylelikle ROS'lar için hedef noktasına haline mitokondriyel DNA (mtDNA)'da ATP üretimi bozulur ve ölümcül hücre hasarı yani apoptoz meydana gelir. Ayrıca ROT'lar mitokondriyal akonitaz ve kompleks I Nikotinamid Adenin Dinükleotit

(NADH) gibi proteinleri okside ederler. İnaktif hale gelen bu proteinler daha sonra oluşacak olan oksijen radikallerinin birikmesine yardımcı olurlar (Ott ve ark., 2007).

1.4. Kanser

Vücudumuzda bulunan belirli bölgedeki hücrelerin, kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasına kanser denilmektedir (Budak, 2022). Diğer bir deyişle, DNA'da meydana gelen bazı mutasyonlar sonucu onkogenler aktive, tümör baskılayıcı genleri ise inaktive eden ve ayrıca epigenom düzensizliği tarafından başlatılan genomik bir hastalıktır (Katti, 2022).

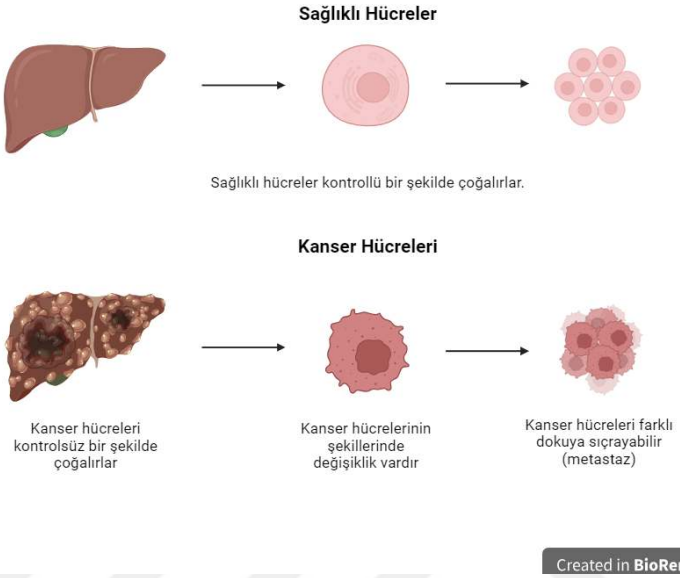
DNA diziliminde meydana gelen bazı değişikler sonucu gözlemlenen kanserin, %10-15'i kalıtımsal olup genlerle bireylere aktarılmaktadır. Geriye kalan %85-90'lık kısım ise DNA'nın mutajenik olan maddelere maruz kalması, beslenme tarzı ve çevresel faktörler gibi etkenlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Bu bahsedilen etkenlere maruz kalınması durumunda normal hücrelerdeki genlerde değişim gözlenir. Daha sonra sağlıklı hücrelerdeki denge, düzen ve hücre proliferasyonunu sağlayan hücre siklusu ve apoptoz etkilendiğinden hücre farklılaşması meydana gelir. Bunun sonucunda da normal hücrelerde kanser görülmeye başlar (Yokuş ve Çakır, 2012).



Şekil 1.12. Normal hücreyle kanser hücresinin çoğalması

Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında farklı birçok özellik vardır. Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörler, normal hücrelerdeki reseptörlere göre daha çok sinyal almaktadırlar. Kontrolsüz çoğalan kanseri hücreleri proliferasyona sebep olurlar ve aynı zamanda yanlarında bulunan hücrelere temas ettikten sonra bölünmeyi

durduramazlar. Glikoz döngüsünden gelen glukozu kanser hücreleri, her tipte bulunan besini ise normal hücreler kullanmaktadır. Ayrıca besin ve oksijen alabilmek için damarlanma sistemini kanser hücreleri oluşturmaktadır. Ve bu sayede dolaşım sisteminde hareket edebilir ve bulundukları noktaya yerleşerek metastazı başlatabilirler (Baykara, 2016).

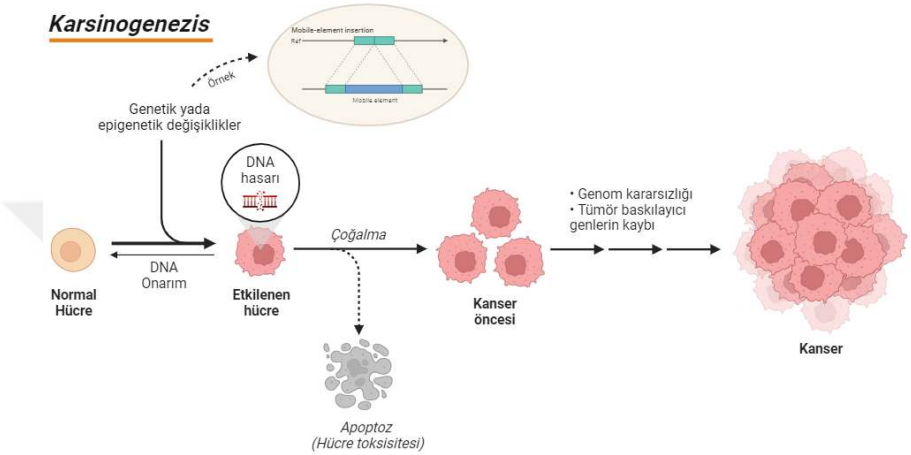


Şekil 1.13. Sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin farkı (Budak, 2022'den modifiye edilmiştir)

Kansere neden olan etmenler arasında çevresel faktörler, alkol, sigara, yetersiz beslenme, kişinin maruz kaldığı kimyasallar ve radyasyon, su ve hava kirliliği bulunmaktadır. Maruz kalınan kimyasallar arasında kaygı verici olanı ise pestisitlerdir. Kanser ve pestisitler arasındaki ilişki ilk olarak yaklaşık 50 yıl önce insektisit olarak kullanılan kimyasalın, cilt ve akciğer kanserinde yüksek prevalans gösterdiğinin bulunmasıyla dikkat çekmiştir (Jungmann, 1966; Thiers ve ark., 1967). Bu bağlamda, pestisitlere maruz kalan kişilerde kanser insidansı çalışmaları yapılmış (Baldi ve Lebailly, 2007) ve farklı neoplazma türlerinin görüldüğü rapor edilmiştir (Jaga ve Dharmani, 2005; Alavanja ve Bonner, 2012). Pek çok pestisit çeşidi karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (Bolognesi, 2003). Son zamanlarda pestisite maruz kalan kişilerde birçok epidemiyolojik çalışma yapılmış ve bunların sonucunda da hematopoetik, beyin, akciğer ve diğer organ kanserleri arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Pestisitler dışında diğer çevresel kirleticiler ile (ağır metaller, toksik inorganik kirleticiler, radyoaktif maddeler) kanser riski açısından da pozitif bir ilişki olduğu raporlanmıştır (Dich ve ark., 1997).

1.4.1. Kanser oluşum mekanizması (Karsinogenezis)

Hücreler hayatlarımız boyunca büyüme ve bölünme gibi birçok mekanizmayı gerçekleştirir. Bu mekanizmaların çalışmadığı durumlarda karsinogenezis gerçekleşebilmektedir. Eğer hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya, invazyon ve metastaz gerçekleştirmeye başlarsa bu duruma karsinogenez denilmektedir (Çelik, 2021).



Şekil 1.14. Karsinogenezisin oluşum süreci

Onkogenlerin aktivasyonu, proto-onkogenlerin (normal hücreler), karsinogenez etkisi göstererek aktif hale geldikleri zaman gerçekleşir. Bu hücreler, çoğalmalarını sağlayan proteinleri aktif hale getirerek onkogenlerin bu proteinleri şifrelemesinden sorumlu olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise, kontrolsüz hücre çoğalmasını ve genomun bütünlüğünü korumak için görev yapan genlerdir. Onkogenlerin şifrelediği proteinleri belirler ve onları etkisiz hale getirmek için çalışırlar. En fazla tanımlanmış tümör baskılayıcı gen p53'dür (Paşalak ve Seven, 2017). Normalde az eksprese olan p53 geni, DNA'da hasar gerçekleştiğinde hücre bölünmesini durdurur ve hasarın değerlendirmesini yapar. Hasar onarılabilecek ise DNA onarım enzimleri hasarlı kısmı çıkarır ve yeniden sentezleme işlemi başlar. Eğer hasar onarılmayacak durumda ise, hücre apoptoza girer. İşte kanser hücrelerinde bu mekanizma çalışmamaktadır. Kanser hücreleri apotozis mekanizmasından kaçarlar ve çoğalmaya devam ederler (Pazarbaşı ve Kasap, 2003).

Karsinogenez Mekanizmasının 3 Temel Basamağı:

1. İnisiyasyon (Başlangıç) : Uzun bir süreçtir. Epigenetik düzenlemeler, kromozom ve DNA hasarı ile karsinogenezis başlar.

2. Promosyon (Artma) : Bu aşamada kararsız olan hücreler büyür ve çoğalırlar.
3. Progresyon (İlerleme) : Son aşamada ise hücrelerin proliferasyonu artar, genomlarına zarar verirler ve en sonunda kötü huylu tümöre dönüşürler (Çiftçi, 2017).

1.4.2. Karaciğer kanseri

Karaciğer organı, ilaçların metabolizmasında ve toksik maddelerin detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir organdır. Karaciğerin asıl görevleri arasında enerji kaynaklarının kontrolü, infeksiyonlara karşı savaş, toksik maddelerin ve ilaçların yıkılması, atılması, bazı proteinlerin ve safranın üretilmesi ve atılımı bulunmaktadır (Baran ve Karasu, 2019).

Karaciğer kanserinin 4 ana türü vardır. Bunlar;

a. Primer karaciğer kanseri
b. Hepatoselüler karsinom (HCC)
c. İntrahepatik kolanjiokarsinom (CCA)
d. Diğer (fibrolameller karsinom, hepatoblastom vb.) (Shirzadfar ve ark., 2019).

Bu türler arasında en sık rastlanılan hepatoselüler karsinomdur. Ayrıca dünya çapında görülme sıklığı en fazla olan dördüncü kanser türüdür (Çelik, 2021).

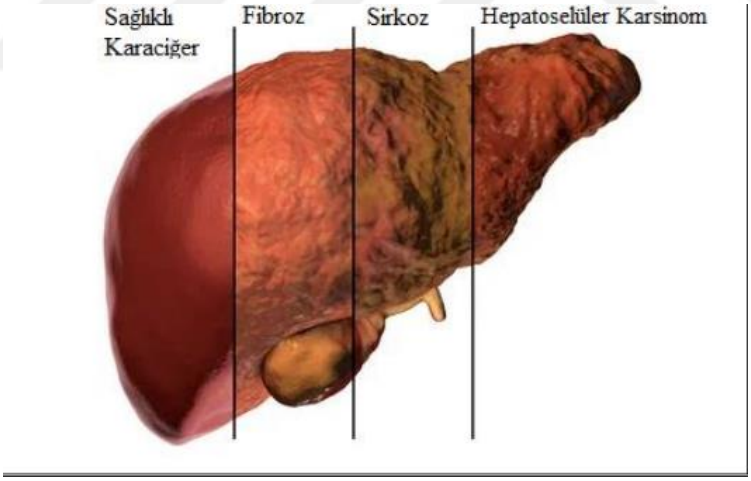
1.4.3. Hepatosellüler karsinom (HCC)

Hepatosellüler karsinomun en önemli risk faktörlerinden biri siroz olarak kabul edilmektedir. Ayrıca konulan tanıların %80'ninde kronik viral hepatit B ve C bulunmaktadır (Taşdan, 2021). Hepatit B virüsü (HBV), *hepadnaviridae* ailesinin bir üyesi olan DNA virüsüdür (Axley, 2018). Bu virüs kaynaklı enfeksiyonlar tedavi edilemez ise siroz ve ardından HCC oluşumu gözlemlenir (Lee ve ark., 2012). Hepatit C virüsü ise enfekte olduğu kişide uzun süre kalır, yıllar içerisinde karaciğer sirozuna ve ardından da HCC oluşumuna yol açar (Güvenalp ve Güvenç, 2020).

HCC oluşumuna neden olan bu risk faktörleri dışında, pesitisitler gibi toksik maddelerin birikimi, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), tip 2 diyabet, alfa-1-antitiripsin ve Wilson hastalığı da risk faktörü olarak sayılabilir (Taşdan, 2021).

Şekil 1.15. HCC risk faktörleri (Çalışkan, 2023)

HCC'de en önemli parametre rejenerasyon yani hücrelerdeki yenilenmedir. Karaciğerde ilk olarak enflamasyon gerçekleşir ve ardından nekroz, fibrozis ve rejenerasyon ile devam eder. Hem rejenerasyon zamanında hem de öncesinde tümör gelişebilmektedir (Nenni, 2019).



Şekil 1.16. HCC'nin oluşum evreleri (123RF.com)

1.4.4. Pestisitlerin kanserojen etkileri

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından çoğu pestisitin kanserojen özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; Aldrin, dikloro difenil trikloroetan (DTT), Dieldrin, miraks, Heptaklor, avadex, strabane, amitrole, araniti klorobenzilat, bis (2-kloroetil) eter, N-(2-Hidroksietil) hidrazin ve pentachloronitrobenzene (PCNB)'dir (Kalıpcı, 2011).

1947 yılında yapılan bir çalışmada, sıçanların yüksek dozda DTT ile beslenmesinin ardından, karaciğerlerinde tümör oluşumu gözlenmiştir (Fitzhugh ve Nelson, 1947). 1969 yılında da DTT'nin etkisi iki fare türünde araştırılmış ve farelerde karaciğer kanseri gözlendiği bildirilmiş (Innes ve ark., 1969). Tüm bu çalışmalar sonucunda DTT'nin hepato karsinojenitesi doğrulanmıştır (Kalıpcı, 2011). Bunlar gibi pek çok çalışma sonucunda DSÖ ve IARC tarafından insanlarda kanserojenik etkiye sahip pestisitlerin listesi yayınlanmıştır (Zeren ve Yaşarbaş, 1989).

Tablo 1.5. İnsanlarda Kanserojen Etkiye Sahip Pestisitler (Zeren ve Yaşarbaş, 1989)

Aldrin	Amitrole	Aramite
Avadex	BHC	Captan
Chloramben	Chlordane	Chlordimeform
Chlorobenzilate	Chlorothalonil	DDD, DDE
DDT	Diallate	Diaminazide
Diclorvos	Dicofol	Dieldrin
Ethylen dibromit	Heptachlor	Hexacholobenzen
Lindane	Mirex	Nitrofen
PCNB	Perthane	Quintozene
Strobane	Toxaphene	Trifluralin

Yıllar içinde çeşitli çalışmalar ile pestisitlerin kanser hücreleri üzerinde etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bir karaciğer kanser hücresi olan HepG2 hücresi de bunlardan biridir. HepG2 hücresinin, organoklorür diklorodifenildikloroetilene (DDE) maruz bırakılması sonucu antioksidan yollarını etkileyen Nrf2 protein seviyesinde bir azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Rives ve ark., 2020). Bir başka insektisit türü olan Chlorfenapyr (CHL), HepG2 hücrelerinde hücresel sitotoksiteyi indirgediği ve ROS birikimine sebep olduğu belirlenmiştir. Mitokondride Ca^{+2} 'nin aşırı birikimi gözlenmiştir. Bunun sonucunda da mitokondriyel hasar meydana gelmiştir ve hücre apoptoza gitmiştir (Ren ve ark., 2022). Yine bir insektisit çeşidi olan imidacloprid, hepatik δ- aminolevulinate dehidrataz (δ-ALA-D) aktivitesini doza bağlı olarak inhibe ettiği ve bu sebeple hücrede oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir (Sauer ve ark., 2014).

Neonikotinoid üyesi olan Thiacloprid (TCP), karsinojenisitesi bildirilmiş olmasına rağmen en yaygın kullanılan neonikotinoiddir ve birincil hedef organı karaciğerdir. HepG2 hücrelerinde DNA hasarı oluşturduğu bilinmektedir (Abou-Zeid ve ark., 2021). Ayrıca HepG2 hücrelerinde 9 pestisitin toksisitesi değerlendirilmiştir. 3 herbisit, 3 fungusit ve 3 insektisit grubundan olan pestisitlerden biri de çalışmamızda kullandığımız asetamipriddir. Fungisitler aralarında en zehirli kabul eden grup olmuştur.

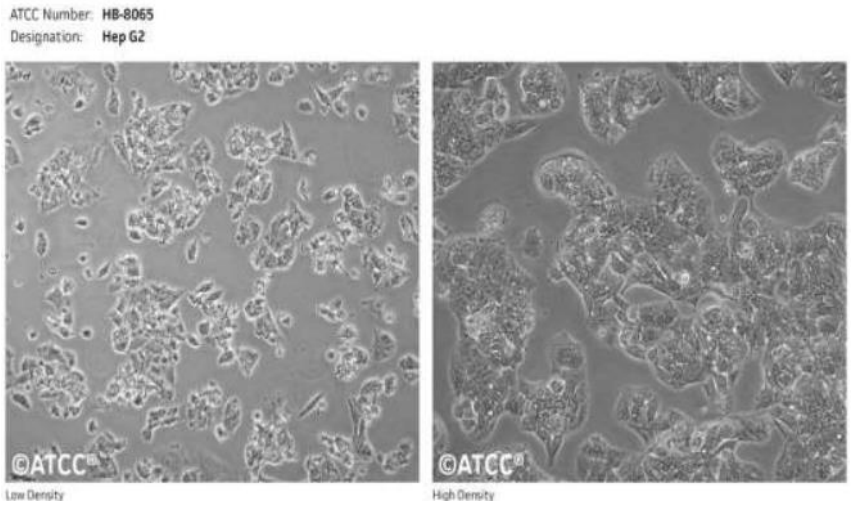
Ardından herbisitler ve insektisitler olarak zehirlilik sıralaması devam etmiştir. Çalışma sonunda hücre zarının bozulduğu ve mitokondriyal değişikliklerin gözlendiği bildirilmiştir (Mesnage ve ark., 2014). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde HepG2 hücre hattı için deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin etkileri daha fazla çalışılması gerekmektedir. Ayrıca iki farklı insektisit grubundan olan bu pestisitlerin birlikte kullanılması durumunda hücredeki farklılıklar ilk kez değerlendirilecektir.

1.5. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Bilgi

1.5.1. HepG2

HepG2, hepatosellüler karsinoma hücre hattıdır. 1975 yılında, Arjantinli 15 yaşındaki erkek bireyden izole edilmiştir (Aden ve ark., 1979). 1980 yılında da Philadelphia Wistar Enstitüsü'ndeki araştırmacılar tarafından '' The Human Hepatoma-Derived Cell Line'' patenti alınmış ve literatüre girmiştir (Çelik, 2021).

HepG2 hücrelerinde ana plazma ve akut faz proteinleri, alfa 2-makroglobulin, alfa 1 antitripsin, fibrinojen, transferrin ve plazminojen salgılarlar (Taşdan, 2021). Ayrıca hücresel protein ekspresyonu açısından insan karaciğer hücrelerine benzerlik göstermektedir (Choi ve ark., 2015) ve yüzey antijenlerinde de hepatit B virüsü bulunmamaktadır (Taşdan, 2021).

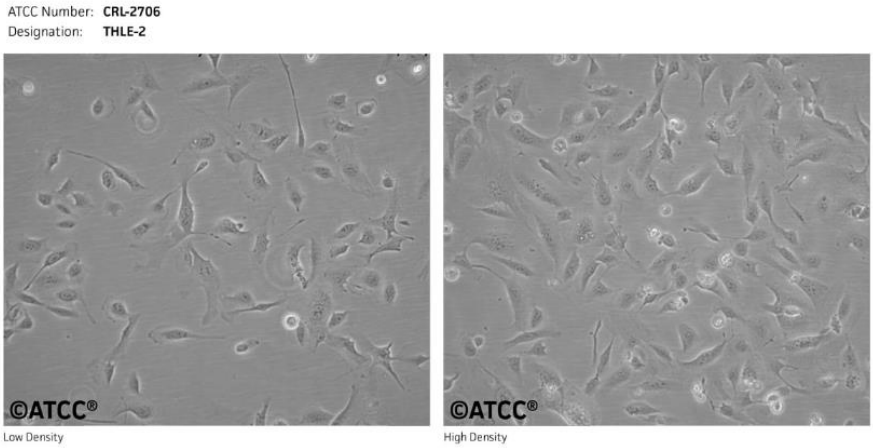


Şekil 1.17. HepG2 (ATCC HB-8065®™) (atcc.org)

HepG2 hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri yüzeyine yapışırlar ve kümecikler şeklinde çoğalırlar. Besiyeri ortamında farklılaşma gösteren bu kümecikler, bir kısmı küresel diğer bir kısmı ise farklı şekilde morfolojik yapı gösterirler (Çelik, 2021).

1.5.2. Thle-2

Thle-2 hücre hattı, insan karaciğer epitel hücresidir. Bu hücre hattı genelde farmakotoksikolojik ve hepatasellüler karsinomun etiyolojisi ve patogenezinin araştırılmasında kullanılan bir *in vitro* modeldir (www.atcc.org). Çalışmamızda HepG2 hücre hattı ile karşılaştırılmasının anlamlı olacağı düşünülmüştür.



Şekil 1.18. Thle-2 (ATCC- **CRL-2706 ™**) (atcc.org)

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

''Deltametrin ve Asetamiprid Pestisitlerinin Thle-2 ve HepG2 Hücre Hatlarının Antioksidan Savunma Sistemleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi'' adlı tez çalışmasında 200'e yakın kaynak araştırması yapılmıştır. Bu kaynaklardan 4 tanesi tez çalışmasının şekillenmesinde kilit rol oynamıştır.

''Acetamiprid ve Alpha-cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferal Lenfositlerindeki In Vitro Genotoksik Etkileri''

2007 yılında Çukurova Üniversitesinin Doktora öğrencisi olan Ayşe Yavuz Kocaman tarafından yapılan tez çalışmasında, asetamiprid pestisitinin kromozom anormalliklerine sebep olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda asetamipridin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğu bulunmuş fakat kesin karar verebilmek için ileri çalışmaların yapılması önerilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile pestisitlerin tek tek muameleleri yerine karışım halinde uygulandıkları zaman toksik etkilerinin arttığına dikkat çekilmiştir (Kocaman, 2007).

''Sıçan Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Deltametrinin Apoptotik ve Oksidatif Etkilerinin İncelenmesi''

Bu çalışma ile deltametrin pestisitinin sıçan karaciğer hücre kültürü üzerinde oksidatif ve apoptotik etkileri gözlenmiştir. Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin, deltametrine maruz kalınması sonucu arttığı tespit edilmiştir. Ancak çalışmada zaman-doz ilişkisine dayalı anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilememiştir (Gacar, 2016).

''Deltametrin ve Thiakloprid İnsektisit Karışımının Akciğer Fibroblastlarında Oksidatif Stres Potansiyelinin ve Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi''

Yapılan çalışmada, deltametrin ve thiakloprid karışım konsantrasyonu 24, 48 ve 72 saat olarak hTERT WHTBF-6 insan akciğer fibroblast hücrelerinde uygulanmıştır. Bu maruz bırakılan sürelerde hücre canlılığı önemli derecede azalmış ve sitotoksisite de artmıştır. Ayrıca MDA seviyesinin artışı gözlemlenen bu çalışmada, DEL+THİA karışımı da ayrıca değerlendirmeye alınmıştır (Karabıyık, 2019).

''Three Widely Used Pesticides and Their Mixtures İnduced Cytotoxicity and Apoptosis Through the ROS-Related Caspase Pathway in HepG2 Cells''

Kanser hücresi üzerinde yapılan bu çalışmada, gıdalarda sıklıkla tespit edilen difenoconazole, cypermethrin ve triazophos pestisitleri kullanılmıştır. Aynı zamanda bu pestisitlerin karışımları da değerlendirmeye tabii tutulmuştur. 3 farklı pestisite maruz kalan HepG2 hücresinde konsantrasyonlara bağlı olarak apoptoz, ROS'da artış, DNA parçalanması ve hücre zarında tahrip olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, Thle-2 ve HepG2 hücrelerin de az veya hiç çalışılmamış olan deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin planlanan tez çalışmasında tekli ve kombine etkileri ilk kez ortaya çıkarılacak ve ileriki çalışmalar için önemli bir veri elde edilmiş olacaktır.

Tablo 2.1. Tez ile İlgili Olduğu Düşünülen Makale Sayısı (NCBI PubMed, 2023)

Konu	Makale Sayısı
Deltamethrin	4011
Deltamethrin and Thle 2	0
Deltamethrin and HepG2	4
Acetamiprid	1190
Acetamiprid and Thle 2	0
Acetamiprid and HepG2	2
Deltamethrin and Acetamiprid	52
Thle-2 and HepG2	38
Deltamethrin and Acetamiprid and Thle 2	0
Deltamethrin and Acetamiprid and Thle 2 and HepG2	0

Yapılan literatür taramasına göre deltametrin ve asetamiprid pestisitleri uzun zamandır üzerinde çalışılan maddelerdendir. Hücre canlılığını azalttığı ve oksidatif strese yol açtığına dair veriler olsa da bu pestisitler, birçok metabolitin yüksek konsantrasyonda biriktiği insan epitel karaciğer hücresinde (Thle-2) herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle deltametrin ve asetamiprid gibi pestisitlerin sitotoksisite ve genotoksisitesi hakkında kesin bir yargıya varabilmek, etki mekanizmalarını ve bu

mekanizmalar arasındaki ilişkilerin belirlenebilmesi, bu pestisitlerin kullanımı ile ilgili gerekli düzenlemelerin yapılabilmesi için daha fazla farklı hücre hatlarında ve farklı yöntemlerin kullanıldığı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda yapılan tez çalışması, Thle-2 hücre hattı için gerekli olan adımların atılması için bir ön çalışma niteliği sağlayacak ve literatüre **özgün** bir değer katacaktır.

Bu çalışmanın amacı, yaygın bir biçimde kullanılan pestisitlerden asetamiprid ve deltametrinin, Thle-2 ve HepG2 hücre hatları kullanılarak sitotoksitelerinin ve antioksidan savunma sistemleri üzerine etkileri belirlenmesidir. Literatürde daha önce bu iki pestisitin etkilerini belirlemek amacıyla Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarını kullanan herhangi bir *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. Asetamiprid ve deltametrinin, hücredeki antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkileri belirlemek amacıyla *SOD*, *CAT* ve *GSTK1* proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre hatları

Çalışmada kullanılan Thle-2 hücre hattı Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN, HepG2 hücre hattı ise Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER tarafından temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve reaktifler

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Kullanım Amacı	Kimyasal ve Reaktifler	Firma Adı
Hücrelerin Rutin Bakımı	DMEM Medium	İnvitrogen
	Penicilin ve Streptomisin	Sigma
	Fetal Sığır Serumu (FBS)	Gibco
	L-Glutamin	Sigma
	Gemtamisin	Biological Insdustries
	Tripsin-EDTA	Biological Insdustries
	PBS	Biological Insdustries
	DMSO	Amresco®
	Giemsa Çözeltisi	Merck
	Metanol ve Formaldehit	Tekkim
İnvazyon Analizi ve Ticari Kitler	XTT Analiz Kiti	Biological Industries, İsrail
	cDNA Sentez Kiti	Thermo
	qPCR Master miks	Qiagen

3.1.3. Makine ve teçhizat

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat

Kullanım Amacı	Makine ve Teçhizat	Firma Adı
Hücresel Çalışmalar	CO_2 İnkübatör	Nüve EC 160
	Laminar Akımlı Kabin	Nüve MN 090
	İnverted Mikroskop	BAB
	Mikroskop Kamerası	Leica
Moleküler Çalışmalar	qPCR Cihazı	Rotor Gene Q 5-Plex
	Vorteks	IKA ® Vortex
	Mini Santrifüj Cihazı	Nüve NF 024
	Santrifüj Cihazı	Nüve NF 400
	Nanodrop Cihazı	Thermo
	ELISA Okuyucu	BIOTEK ELX808
	Jel Yükleme Cihazı	Thermo Scientific
	Jel Görüntüleme Cihazı	Syngene
Malzeme Saklama	Buzdolabı (+4 ºC)	Vestel
	Buzdolabı (-20 ºC)	Vestel
	Derin Dondurucu (-80 ºC)	ARCTIKO
Diğer Cihazlar	Masaüstü Bilgisayar	Hewlett Packard (HP)
	Dizüstü Bilgisayar	Huawei core i5

3.2. Metot

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1. Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarının iki boyutlu geliştirilmesi

Thle-2 ve HepG2 hücre hatları için besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. Bu besiyerinin içerisine %1'lik penicilin/streptomisin, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 L-Glutamin eklenmiştir. Ayrıca Thle-2 hücre hattının üretildiği besiyerine %1 gentamisin antibiyotiği eklenmiştir. 37ºC'de %5 karbondioksit inkübatöründe, T75 flasklarda büyümeye bırakılan hücreler, flask yüzeyinin %80'inin kaplanmasının ardından pasajlanmıştır.

Şekil 3.1. Flask ortamındaki hücreler

3.2.1.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler flaskın tabanında gidecek yerleri olmadığında yani çoğalacakları bir ortam kalmayınca besiyerinden faydalanamazlar ve kontakt inhibisyon diye adlandırılan mekanizma ile çoğalmaları durur. Hatta çoğalan, yaşamakta olan hücreler besiyerinden faydalanamadıkları için ölmeye başlarlar. Bu durum hücre kültürü çalışmalarında istenmeyen bir durum olduğu için hücreler pasajlanır. Pasajlanma yani diğer bir adıyla seyreltme işlemi, hücrelerin flask yüzeyinden bir substart ile ayrılması işlemidir. Ayırdığımız hücreleri üç farklı şekilde değerlendiririz. İlk olarak bir sonraki çalışmalarımız için, ikinci olarak hücremizin ana stok sayısını çoğaltmak adına dondurmak için ve son olarak yeni bir kültür kabına, flaska aktarmak için kullanırız. Hücre pasajlama sırası şu şekildedir;

1) Flaskın içerisinde bulunan kirli besiyeri ortamdan uzaklaştırılır.
2) Flaskın yüzeyini ölü hücre kalıntılarından ve uzaklaştırılan kirli besiyerinden iyice temizlemek için 5 mL 1xFosfat Tamponlu Salin (1xPBS) ile yıkanır.
3) Canlı hücreler flaskın tabanına yapışık haldedirler. Bu nedenle 2 mL tripsin-EDTA eklenerek 37^{o}C'de, 1-2 dakika inkübe edilir ve yüzeye kalkmaları sağlanır.
4) Flask tabanından kalkan hücrelerin üzerine, hücreleri tripsinin toksik etkisinden korumak amacıyla 4 mL hücre besiyerinden eklenir.
5) Daha sonra flaskın içinde 1 mL hücre bırakıp üzerine 12 mL besiyeri eklenir. Toplanılan hücreler ise falkon tüpüne eklenerek yapılacak uygulamaya göre işlemleri devam eder.

3.2.1.3. Hücre sayımı

Tripan mavisi boyası ile yapılan hücre sayımı, kromoforun negatif yüklü olduğu ve membranında hasar olan hücrelerde etkileşime girdiğinden dolayı ölü hücrelerin maviye boyandığı bir tekniktir. Burada ölü hücreler boyanırken yaşayan hücrelerde herhangi bir boyanma söz konusu olmaz. Tripsin-EDTA ile kaldırılıp medium eklenen hücrelerden 250 µL, tripan blue boyasından ise 25 µL eklenerek bir ependorf da karıştırılmış (10:1 oranında) ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra hemositometri (thoma lamı) üzerinde hücreler 3'er kez sayılıp ortalaması alınmıştır.

Denklem 3.1. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

1mL'deki Hücre Sayısı = Karelerdeki Hücre Sayısı x Seyreltme Faktörü x 4 x 10^6

3.2.2. Sitotoksisite analizi (XTT assay)

İki boyutlu geliştirilen Thle-2 ve HepG2 hücrelerinde, asetamiprid ve deltametrin maddelerinin etkilerini görmek ve hücrelere uygulanacak dozu belirlemek için sitotoksisite analizi (XTT Assay) yapılmıştır.

İki boyutlu olarak geliştirilen hücrelere, Cell Proliferation XTT (2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)2H- tetrazolyum) temelli sitotoksisite analiz kiti kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Ata, 2020). 96 kuyucuklu welle $8x10^3$ (8000 hücre) gelecek şekilde hücreler ekilmiştir. İlk kolon besi yeri kontrolü olarak ayrılmıştır ve oraya hücre ekimi yapılmamıştır. Buradaki amacımız, hücrede gerçekleşecek olan ölümlerin besiyerindeki herhangi bir kontaminasyondan kaynaklanmadığına emin olmak için yapılmıştır. Ekimden bir süre sonra üçüncü kolondan itibaren deltametrin ve asetamiprid maddeleri seri dilüsyonlar halinde kuyucuklara uygulanmıştır (her madde için ayrı 96'lık well kullanılmıştır). İkinci kolon ise % 100 büyümenin varsayıldığı kontrol grubu olarak bırakılmıştır. 24 ve 48 saat sonra formazan boyası eklenmiş XTT kimyasalı (Her 96 kuyucuklu plaka için 1 şişe XTT Reagent A ve 100 µL XTT Reagent B) her kuyucuğa eklenerek 5 saat 37ºC'de inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra 450 nm absorbans aralığında ELISA okuyucuda optik yoğunluklar hesaplanmıştır. Kontrol hücre kolonunda %100 büyüme gerçekleşmiş ve buradaki orana göre deltametrin ve asetamiprid maddelerinin her kuyucuktaki konsantrasyona denk gelen büyüme oranı saptanmıştır. Sonuç olarak hücrelerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3. Hücre motilite testi (Yara iyileştirme deneyi)

Hücrelerin metastatik kabiliyetini belirleyebilmek için hücre göç analizi yapılmıştır (Kim ve ark., 2018). Her bir hücre hattı için ayrı olarak 24 kuyucuklu bir plakada her kuyucuğa yaklaşık $5x10^5$ hücre ekilmiştir. Bir günün sonunda hücreler flask yüzeyinin %80'nini kaplandığı gözlenmiştir. Daha sonra 10 µL pipet ucu (beyaz renkte) ile, tek tabaka halinde hızlı bir şekilde dikey bir yara çizilmiştir. Daha sonra hücreler 0., 24., ve 48. saat aralıklarında inverted mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.2.4. DAPI boyama

Floresan madde olan DAPI (4,6-diamidine-2-'phenylindole), DNA'ya bağlanabilen bir boyadır. Bu sebeple hücre kromatini ve dolayısıyla nükleusu görünür (Güleş ve Eren, 2008). DAPI, 358 nm dalga boyunda maksimum absorbsiyona, 461 nm dalga boyunda ise maksimum emisyona sahiptir. Bu nedenle floresan mikroskobunda

mavi/mavi filtre ile saptanmaktadır. Hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale gelip orada meydana gelen morfolojik değişiklikleri anlayabilmek için DAPI kullanılmıştır (Yaman, 2015). DAPI, ThermoFisher protokolüne uygun hazırlanmıştır. DAPI uygulama basamakları;

- 12'lik wellere ekilen hücrelerin kirli mediumu çekilir.
- Ardından medium kalıntısı kalmaması için kuyular PBS ile yıkanır.
- Her kuyu için 500 µl DAPI solüsyonu eklenir.
- Hücreleri ışıktan koruyarak 20-30 dakika bekletilir.
- Hücreler 2-3 kez PBS ile yıkanır ve floresan mikroskobunda görüntülenir.

3.2.5. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (ing. RT-PCR)

3.2.5.1. Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarının rna izolasyonu ve DNaz ile muamelesi

RNaz inaktivasyonunu sağlamak amacıyla kullanılacak tüm materyaller dietil karbonat (DEPC) ile muamele edilmiş distile su ile temizlenmiş ve solüsyonlar DEPC-su ile hazırlanmıştır. Hücrelerden total RNA izolasyonu Trizol (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık $1x10^6$ ile $5x10^6$ arasında olan iki boyutlu hücrelerden besiyerinin tamamen uzaklaştırılmasının ardından 1 mL Trizol ilave edilip izolasyon yapılmadan önce -80C'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu Invitrogen firmasının Trizol protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Trizol eklenen hücreler oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından 1 ml Trizol için 200 µL kloroform eklenmiştir. Oda ısısında 2-3 dakika inkübasyon sonrasında karışım $+4^0$C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santifügasyon aşamasının ardından karışım alt, orta ve üst olmak üzere 3 faza ayrılmıştır ve RNA'yı içeren üstteki sıvı faz ependorf tüpü 45 derecelik bir açıda tutarak pipet ile temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan sıvı fazın üzerine 500 µL soğuk izopropanol eklenmiş, oda ısısında 10 dakikalık inkübasyonun ardından soğutmalı santrifüjde $+4^0$C'de 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamanın ardından tüpün alt kısmında jelimsi şeffaf bir pelet oluşmuştur. RNA'yı içeren bu pelete zarar vermeden süpernatan kısmı tüpten uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, peletin üzerine %75'lik etanol solüsyonundan 1 mL eklenmiş, vorteks ile karıştırılmış ve $+4^0$C'de 7500 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelete dokunulmadan supernatan uzaklaştırılmış ve pelet 5-10 dakika oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Bu sayede etanolün uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Kurutma aşamasını takiben pelet 30 µL RNaz'dan arındırılmış (RNase free) suda çözünmüştür.

Örneklerde bulunan olası DNA kontaminasyonundan kurtulmak amacıyla tüm izole edilen RNA'lar TurboDNAse free kit (Ambion) ile DNaz muamelesine tabii tutulmuştur.

3.2.5.2. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık ölçümleri

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı, Nanodrop (Thermo) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Nükleik asitler 260 nm'de maksimum absorbans gösterirler ve bu cihaz ile örneklerin 260 nm ve 280 nm'de verdiği absorbans değerleri oranlanır (A_{260}/A_{280}). İdeal olan RNA saflık oranı yaklaşık olarak 2.0 olmalıdır. Toplam RNA saflığının nicelleştirilmesi için kullanılan denklem şu şekildedir;

Denklem 3.2. Toplam RNA Saflığının Niceleştirilmesi
[RNA] = A_{260} x Seyreltme Faktörü x RNA'nın Ortalama Ekstinksiyon Katsayısı (40.0)

Thle-2 ve HepG2 hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinden DNaz muamelesi öncesinde ve sonrasında 2 µL alınıp cihaza yüklenmiştir. Cihazın verdiği konsantrasyon ve saflık değerleri cDNA sentezinde kullanılacak RNA miktarını belirlemek üzere kaydedilmiştir.

3.2.5.3. RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonlarına ek olarak bütünlüklerinin de kontrol edilmesi sonraki moleküler basamaklar için önem arz etmektedir. Degrade olmuş bir RNA örneği ile çalışmak, başarısız sonuçlar elde etmeye sebebiyet verir. Bu nedenle cDNA sentezi ve qPCR basamakları öncesi RNA'ların degrade olmadığından ve bütünlüğünü koruduğundan emin olmak amacıyla agaroz jel elektroforezi ile RNA bütünlüğü kontrol edilmiştir. Bu amaçla tüm elektroforez ekipmanı RNAzap solüsyonu ile temizlenmiş ve DEPC-su ile durulanmıştır. RNazlardan arındırılmış Tris asetat EDTA (1xTAE) tamponu kullanılarak hazırlanan %1 'lik agaroz jelde RNA örnekleri yürütülmüştür. Bu oran baz alınarak 0.5 gram agaroz ve 50 mL 1xTAE Tamponu birleştirilerek 3 dakika mikrodalga fırınında çözdürülmüştür. Eriyen agaroz jel karışımı 2 dakika soğumaya bırakılarak 3 µL SYBR Gold boyası (Invitrogen) eklenmiştir. Elektroforez aparatına dökülen agaroz jele dikkatlice tarak yerleştirilmüş ve u aşamada jelde kabarcıkların olmamasına dikkat edilmiştir. Jelin polimerleşmesinin ardından tarak çıkarılmış ve 3 µL RNA örneği ve 1 µL RNA yükleme boyası karıştırılıp tarağın

oluşturduğu kuyucuklara tek tek yüklenmiştir. Ayrıca ilk ya da son kuyucuğa RNA Marker yüklenir. Yükleme işlemi bitince RNA örnekleri sabit akımda (70-80 mA: miliamper) 30 dakika yürütülmüştür. UV ışığı altında jel görüntüleme cihazında (Sygene) RNA örnekleri fotoğraflanmıştır.

3.2.5.4. cDNA sentezi

İzole edilen tek zincirli mRNA'nın, çift zincirli komplementer DNA'ya yani cDNA'ya çevrilmesi gerekir. Bu sebeple cDNA sentezi yapılır. cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA kiti (Thermo) kullanılmıştır. Komplementer DNA sentezi için başlangıç olarak 1µg RNA kullanılmıştır ve tüm örneklerden konsantrasyonlarına göre 1 µg olacak şekilde hacim pipetlenmiştir. cDNA sentezi için kit içerisinde bulunan "random hekzamer" primer kullanılmıştır. İlk basamak olarak RNA, su ve 1 µL random primer ile bir reaksiyon hazırlanmış ve bu karışım PCR cihazında 5 dakika 65^0C'de inkübe edilip ardından 1 dakika buz blok üzerinde bekletilmiştir. Bu işlemler sonucunda kalıp RNA üzerindeki katlanmalar denatüre edilmiş ve primerin bağlanması için ortam hazırlanmıştır. İkinci basamakta ise bu karışımın üzerine sırasıyla 4 µL Reaksiyon Tamponu (5X), 1 µL RiboLock RNaz inhibitörü (20 U/µL), 2 µL dNTP karışımı (10 mM) ve 1 µL RevertAid M-MuLV RT enzimi (200 U/µL) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı PCR cihazında 25ºC'de 5 dakika, 42ºC'de 60 dakika ve 70ºC'de 5 dakika basamaklarından oluşan bir programda inkübe edilmiştir. cDNA reaksiyonu sırasında her örnek için "-RT kontrol" sentezlenmesi de gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerde reverse transkriptaz enzimi yerine aynı miktarda su reaksiyona eklenmiştir ve bu sayede örneklerde herhangi bir DNA kontaminasyonunun olup olmadığı PCR reaksiyonunda belirlenebilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar gen ekspresyonu analizi için kullanılmadan önce 1:10 oranında sulandırılmıştır.

3.2.5.5. Gen ifadesi ölçümü

Antioksidan savunma sistemi üyesi Katalaz, glutatyon S transferaz ve süperoksit dismutaz enzimlerini kodlayan sırasıyla *CAT*, *GSTK1* ve *SOD1* genlerinin ifade düzeyleri Rotor Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen) kullanılarak ölçülmüştür. Primerler bu çalışmada tasarlanmış olup, dizi ve ürün boyut bilgileri Tablo 3.3 'te detaylı olarak verilmiştir. Deltametrin, asetamiprid ve deltametrin+asetamiprid maddelerine 24 saat boyunca maruz bırakılan Thle-2 ve HepG2 hücrelerinden izole edilen RNA'lardan

sentezlenen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak insan *CAT*, *GSTK1* ve *SOD1* genlerinin ifade düzeyi ölçülmüştür. House keeping gen olarak beta-actin (*ACT*) geni kullanılmıştır. qPCR reaksiyonu 5 µL Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix (2X), 1 µL ileri primer (10 mM), 1 µL geri primer (10 mM), 1 µL cDNA (1:10 sulandırılmış) ve 2 µL DNA/RNA free su içermektedir. qPCR reaksiyonu Rotor-Gene Q 5-plex cihazında 95ºC'de 5 dakika ilk denatürasyon, 40 döngü olacak şekilde 95ºC'de 5 saniye ve 60ºC'de 10 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca primerlerin erime eğrilerini görmek ve dimer oluşumunu kontrol etmek amacıyla programa bir erime basamağı da eklenmiştir.

Elde edilen floresan okumaları Rotor-Gene Q Series Sofware (Versiyon 2.3.5) yazılımında analiz edilmiş ve eşik döngüsü (cycle of threshold, CT) belirlenerek örneklerin ilk kez ifadesinin ölçüldüğü döngü numaraları belirlenmiştir. Daha sonra Livak ve Schmittgen (2001) tarafından önerilen 2(-Delta Delta C(T)) metodu ile gen ifadesi düzeyleri her bir örnek için belirlenmiştir.

Tablo 3.3. İfadesi Ölçülen Genlerin Primer Dizileri, Boyutları

Gen adı	**Erişim numarası**	**İleri primer (F) (5'→3') Geri primer (R) (5'→3')**	**Ürün boyutu (bç)**
ACT	NM_001101.5	F: GAGACCGCGTCCGCC R:ATCATCATCCATGGTGAGCTGG	90
CAT	NM_001752.4	F:CTCCGGAACAACAGCCTTCT R:ATAGAATGCCCGCACCTGAG	110
GSTK1	NM_015917.3	F:GCTTCCCCGCAAAGGACTAT R:GCATGGCAGACAAACTTCCTTTT	128
SOD1	NM_000454.5	F:GGTGTGGCCGATGTGTCTAT R:GCTTTTTCATGGACCACCAGT	92

3.2.5.6. İstatistiksel analiz

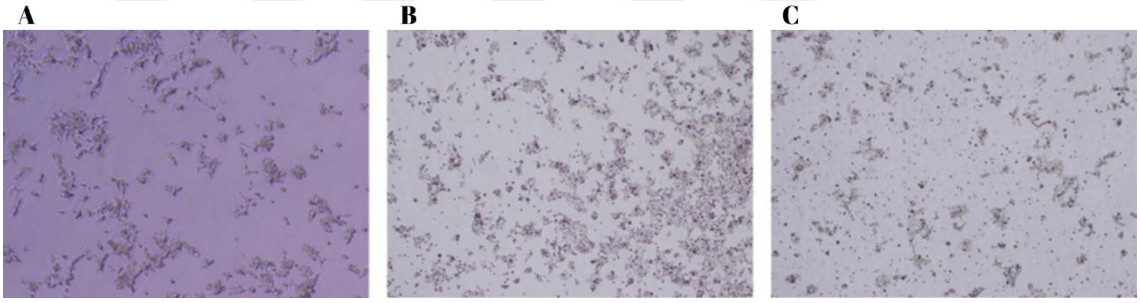
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 10 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genlerin ifade seviyeleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı Kruskal-Wallis analizi yapılarak test edilmiştir. P değeri 0.05'ten küçük olan farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($P<0.05$).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

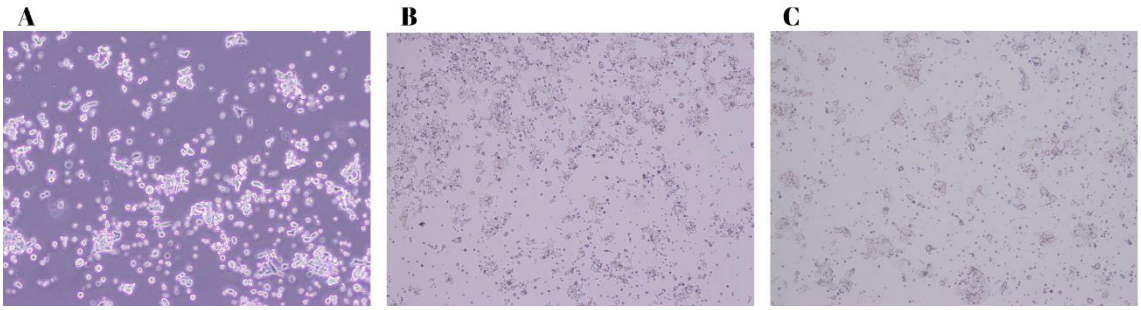
4.1. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı Sitotoksisite Sonuçları

Thle-2 hücre hattı 96 kuyucuklu plakaya ekildikten 24 saat sonra tabanı tamamen kapladığı gözlenmiştir. Ardından deltametrin, asetamiprid ve iki pestisitin karışımları seri dilüsyonlar halinde altı farklı plakaya verilmiştir. 24 ve 48. saatin sonunda 450 absorbans aralığında ELISA okuyucuda sitotoksisite değerleri belirlenmiştir.

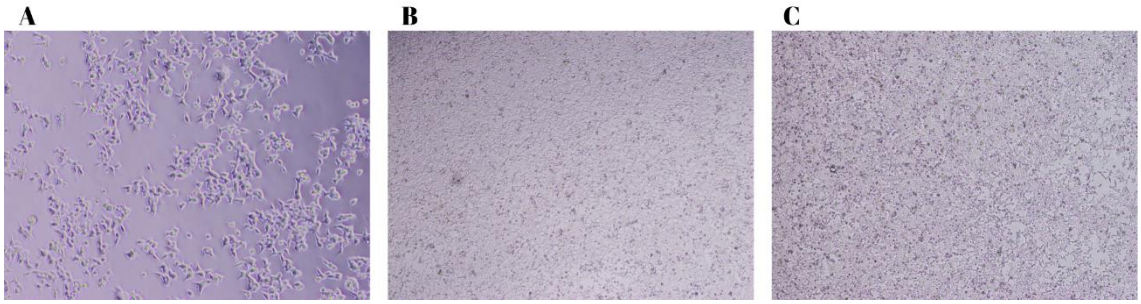
Deltametrin pestisiti için IC_{50} değeri; 100 mM, asetamiprid pestisiti için IC_{50} değeri; 250mM olarak belirlenmiştir. İki pestisitisin karışımı sonucu IC50 değeri ise Deltametrin 10 mM + Asetamiprid 225 mM olarak bulunmuştur. Bu değerleri belirledikten sonra ilk defa Thle-2 hücre hattını kullandığımız için hücreleri 12 kuyucuklu plakaya ekip morfolojik yapıları 24, 48, 72. saat boyunca incelenmiş ve görüntülerini çekilmiştir.



Şekil 4.1. Thle-2 hücre hattının 100 mM deltametrin ile muamelesi
A: Thle-2 24.saat B:48.saat C:72.saat



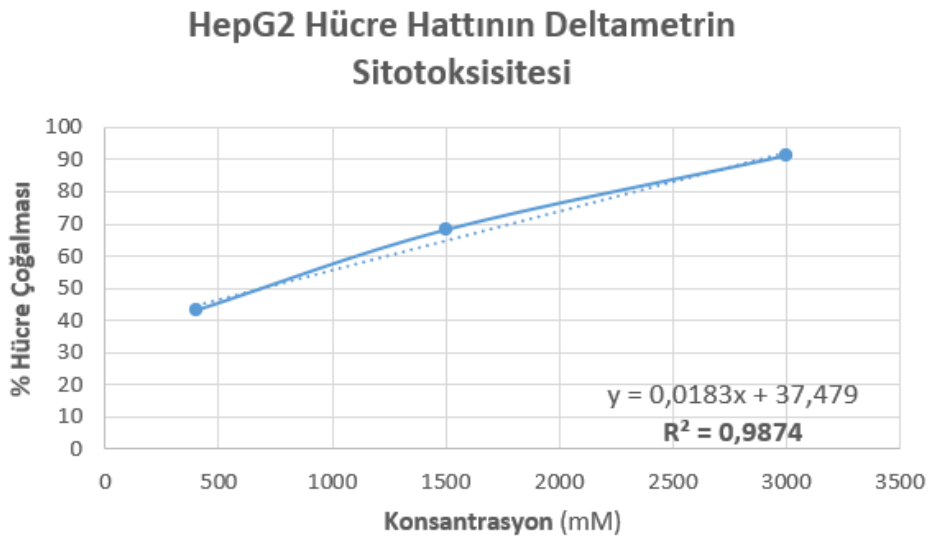
Şekil 4.2. Thle-2 hücre hattının 250 mM asetamiprid ile muamelesi
A: Thle-2 24.saat B:48.saat C:72.saat



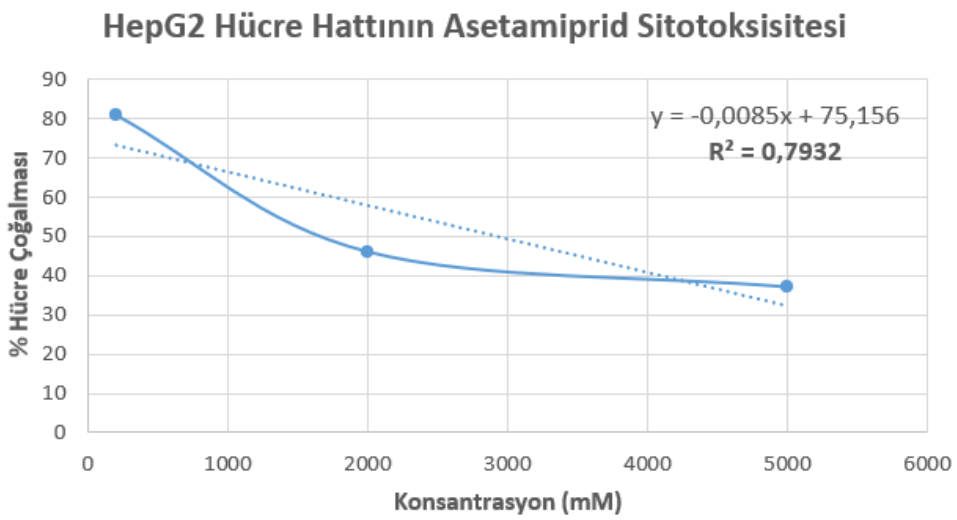
Şekil 4.3. Thle-2 hücre hattı kontrol
A: 24.saat B: 48.saat C: 72.saat

Thle-2 hücre hattında deltametrinin daha düşük dozda bile asetamipride göre toksik etki gösterdiği gözlenmiştir.

Aynı işlemler HepG2 hücre hattı içinde uygulandıktan sonra deltametrin pestisiti için IC_{50} değeri; 710 mM (Şekil 4.4.), asetamiprid pestisiti için 2940 mM (Şekil 4.5.) bulunmuştur. Thle-2 hücre hattında olduğu gibi HepG2 hücre hattında da deltametrin daha toksik etki ettiği gözlenmiştir. Daha sonra bu dozlara göre karışımlarının IC_{50} değeri hesaplanmıştır ve Deltametrin 300mM + Asetamiprid 500 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. HepG2 hücre hattının deltametrin sitotoksisitesi

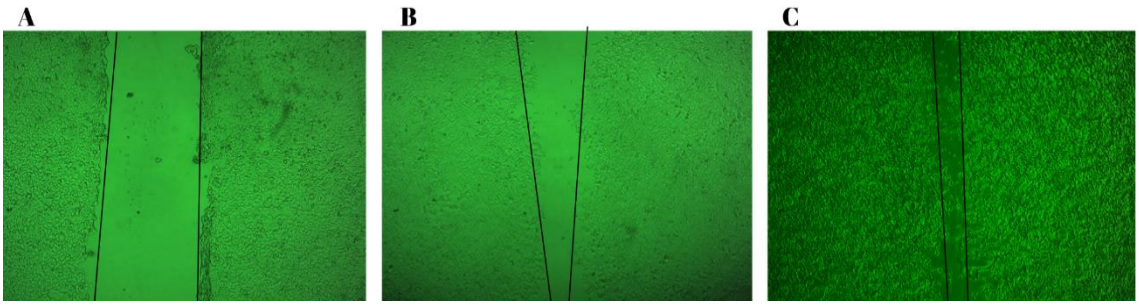


Şekil 4.5. HepG2 hücre hattının asetamiprid sitotoksisitesi

Karaciğer kanseri hücresinin (HepG2), her iki pestisit türü için de ölüm dozları, normal karaciğer hücresine (Thle-2) göre daha yüksek olduğu belirlendi. Normal karaciğer hücresinde toksik olan dozlar (Deltametrin için 100 mM, asetamiprid için 250 mM) karaciğer kanser hücresine uygulandığında hücrelerde artışın meydana geldiği görülmüştür. Bunun sebebi olarak, kanserli hücrelerin, normalde bizim için toksik olabilecek oranlarda arttığı ve daha kötü bir duruma ilerlediği anlaşılmıştır. Ayrıca kanser hücresinde yüksek oranlarda ölüm gerçekleşse bile bu oranlar diğer hücrelerimiz için daha riskli bir hale gelebileceği unutulmamalıdır.

4.2. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı Motilite Sonuçları

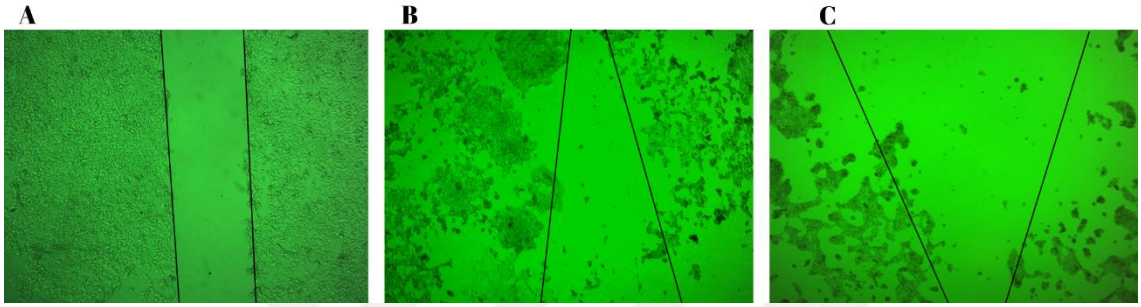
Yaklaşık 200.000 kontrol Thle-2 hücre hattı 12'li kuyucuk plakalara ekilmiştir. 24 saat sonra yüzeyin %80'i kaplanmıştır ve yara açılmıştır. Yaranın açıldığı an 0. Saat olarak belirlenmiştir. Daha sonra 24 ve 48. Saatlerde 10x mikroskop lensi altında aynı bölge fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.6. Thle-2 kontrol migrasyon
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

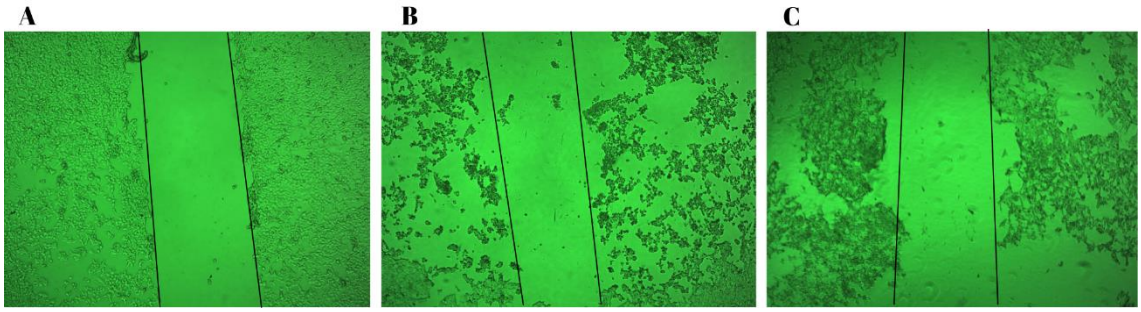
Şekil 4.6. da görüldüğü üzere hücreler her saat kapanmaya doğru gitmiştir. ImageJ programı ile de bu yaraların açıklıkları hesaplanmıştır. Yarayı açtığımız saat olan 0.saatte yara alanı 1.335.434, 24.saatte 509.324 ve 48.saatte de 139.921 olarak hesaplanmıştır.

Yine aynı şekilde 200.000 Thle-2 hücre hattı 12'lik wellere ekilmiştir. Ardından 24 saat sonra %80'i kaplanmıştır ve yaralar açılmıştır. Yaralar açıldıktan hemen sonra deltametrin, asetamiprid ve deltametrin + asetamiprid karışımlarının belirlediğimiz IC50 değerleri uygulanmıştır. Deney 3 kere tekrar edilmiştir.



Şekil 4.7. Thle-2 100 mM deltametrin uygulaması
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

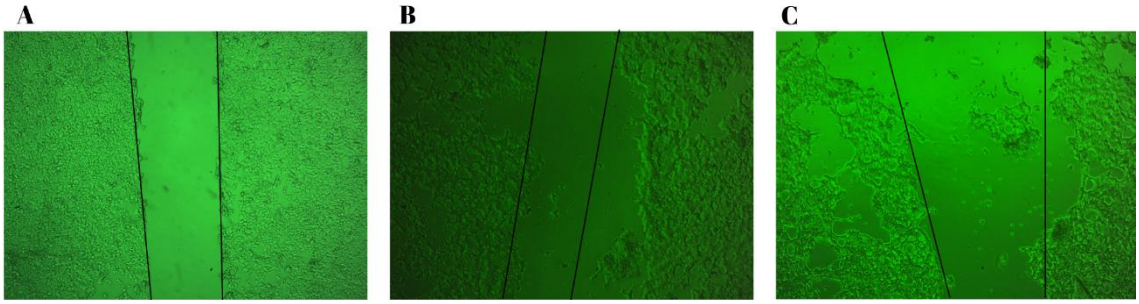
Şekil 4.7. de görüldüğü gibi deltametrin, Thle-2 hücre hattında oldukça fazla açılmalara sebep olmuştur. Fotoğrafta gösterilen çizgiler aslında yaranın olması gerektiği kısımdır fakat deltametrin o kadar etkili olmuştur ki yaranın alanı açılmış ve yara çizgileri kaybolmuştur. ImageJ programı ile hesaplanan bu alanlar şu şekildedir; 0.saat 1.031.930, 24.saat 2.627.675 ve 48.saat 4.089.395'tir. Bu alan hesaplamaları göz önüne alındığında saat ile doğru orantılı bir şekilde yaranın giderek açıldığı görülmüştür.



Şekil 4.8. Thle-2 250 mM asetamiprid uygulaması
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

Deltametrinde olduğu gibi asetamiprid de yara çizgileri tamamen kaybolmamıştır. Fakat yine de yara alanı dışında da açılmalar meydana geldiği görülmüştür. 250 mM

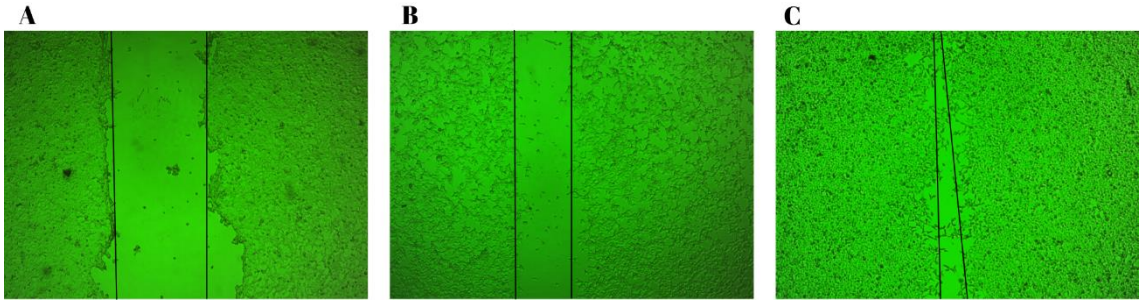
asetamiprid uygulamasında yara alanları 0.saatte 1.219.405, 24.saatte 1.543.979 ve 48.saatte 1.823.082 şeklinde hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Thle-2 10mM Deltametrin + 225 mM Asetamiprid karışımı
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

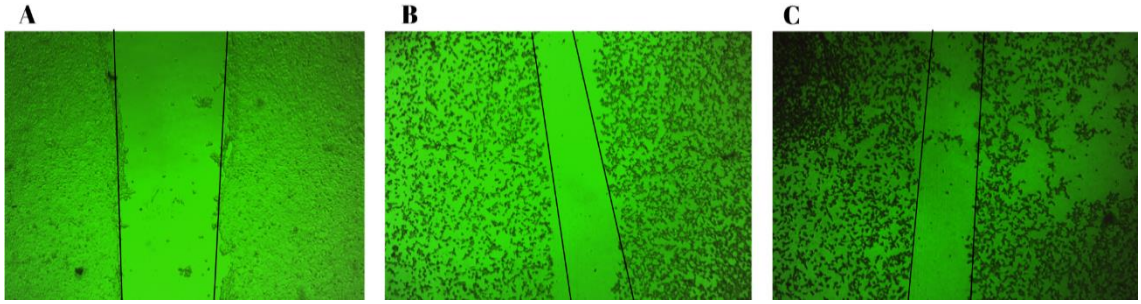
Deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin karışımıyla muamele olan yara, saatle doğru orantılı bir şekilde açılmış ve alanı genişlemiştir. ImageJ programı ile alan hesaplaması sonucu 0.saatte 1.030.339, 24.saatte 1.310.812 ve 48.saatte 2.289.079 olmuştur.

HepG2 hücre hattı içinde yaklaşık 200.000 hücre 12'li wellere ekilmiştir. Ekilen hücreler morfolojilerini kazandıktan sonra (genelde ekimden 24 saat sonra) 10 µL pipet ucu ile hücrelere yara açılmıştır. Deltametrin, asetamiprid ve karışımlarının belirlediğimiz IC_{50} dozları yara açıldıktan hemen sonra hücrelere uygulanmıştır.



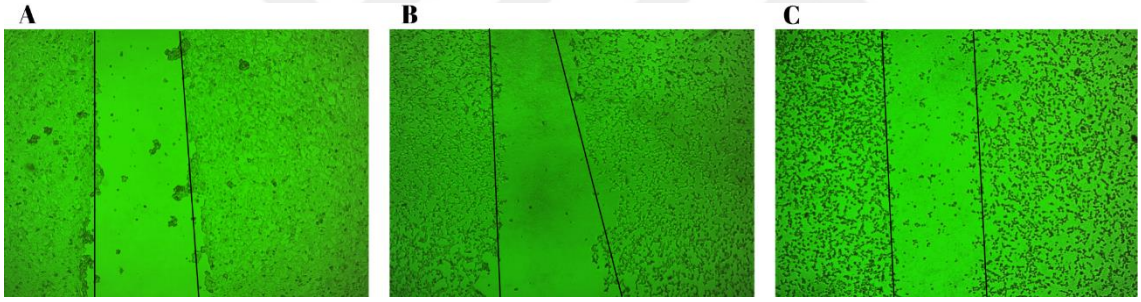
Şekil 4.10. HepG2 kontrol
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

HepG2 hücre hattında kontrol grubunun saatle doğru orantılı bir şekilde yaranın kapandığı görülmüştür. Image J programı ile yara alanı ölçülmüştür ve 0.saatteki yara alanı 1.436.303, 24.saatteki yara alanı 824.181 ve 48.saatteki yara alanı 211.822 olarak ölçülmüştür.



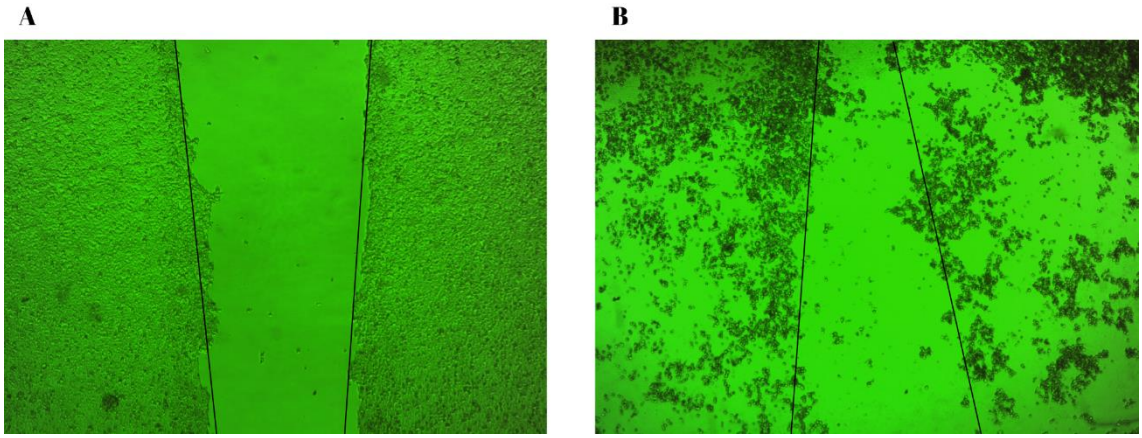
Şekil 4.11. HepG2 710 mM deltametrin uygulaması
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

HepG2 hücre hattında deltametrinin, hücrelerin morfolojilerini bozduğu ve yara alanında herhangi bir kapanmanın olmamasının yanı sıra hücrelerin başka yerlerinde alanlarının açıldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar Image J programı ile verilere dayanarak kanıtlanmıştır. 0.saatte açılan yaranın alanı 1.367.598 iken 24.saatte 1.560.794'e yükselmiş, 48.saatte ise bu alan yaklaşık iki katına çıkarak 2.351.064 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. HepG2 2940 mM asetamiprid uygulaması
A: 0.saat B: 24.saat C: 48.saat

Deltametrin kadar toksik etkisi olmayan asetamiprid, HepG2 hücresinde morfolojinin değişmesine ve yara alanının açılmasına sebep olmuştur. Fakat bu etki deltametrin kadar değildir. Deltametrinin yaklaşık iki katı katı kadar kullanılmasına rağmen yine de asetamipridin 48.saatindeki etkisi, deltametrinin 24.saattindeki etkisi ile eş değerde olduğu tahmin edilmektedir. Çünkü Image J ile yara alanlarının ölçüleri bu saat aralığında hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir. HepG2 hücresine uygulanan 2940 mM'lık asetamipridin 0.saatindeki yara alanı 1.300.141, 24.saatinde 1.396.519 ve 48.saatinde 1.785.584 olarak hesaplanmıştır.

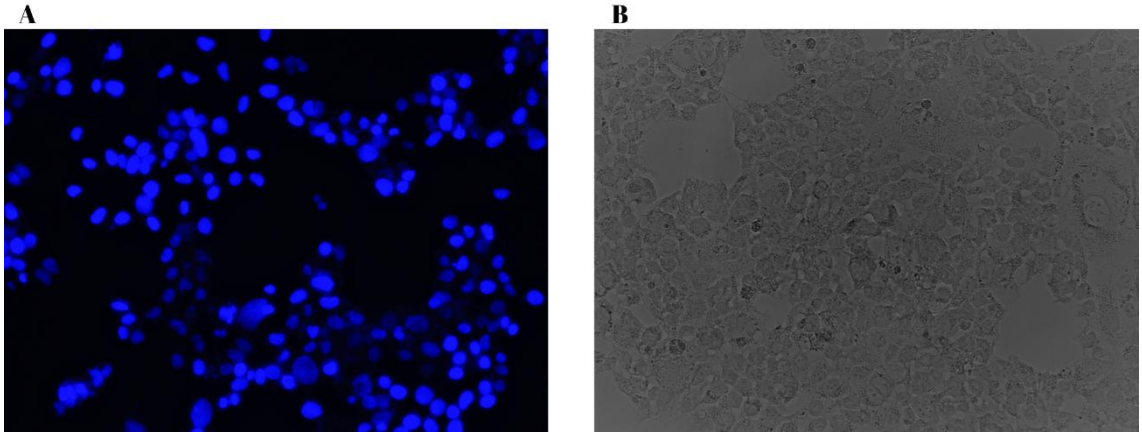


Şekil 4.13. HepG2 300 mM Deltametrin + 500 mM Asetamiprid karışımı
A: 0.saat B: 24.saat

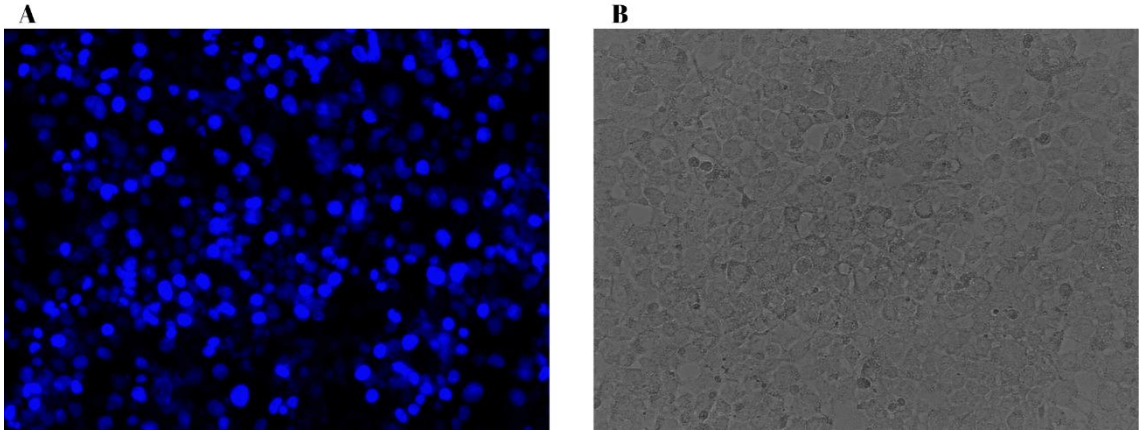
Deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin karışımı HepG2 hücre hattına uygulanmıştır. 0.saatteki yaranın alanı 1.448.818 iken 24.saatteki alanı 3.081.213'e yükselmiştir. HepG2 hücresinin en geniş yara alanı, pestisit karışımında elde edilmiştir. Bu karışım dozlarında 48.saatin görüntüsü alınamamış ve yara tamamen kaybolmuştur.

4.3. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı DAPI Boyama Sonuçları

DAPI boyası ile boyanan hücrelerde çekirdek yapılarını ve yaptıkları ışımaya göre canlı hücrelerin varlığını tespit ettik. Hücrelere ilaç verdikten sonra 24 ve 48. saatlerinin görüntüleri fotoğraflanmıştır. Thle-2 kontrol grubunda (Şekil 4.14. ve 4.15.) canlı hücrelerin ne kadar iyi boyayı içine alıp ışıma yaptıklarını görülmektedir. Thle-2 hücreleri çok hızlı çoğalan bir hücre hattı olduğu için kısa bir zamanda besiyerini kullanıp, kuyucuğu doldurduğu için kontrol grubundaki ölümlerin gerçekleştiğini bu sebeple görmekteyiz.



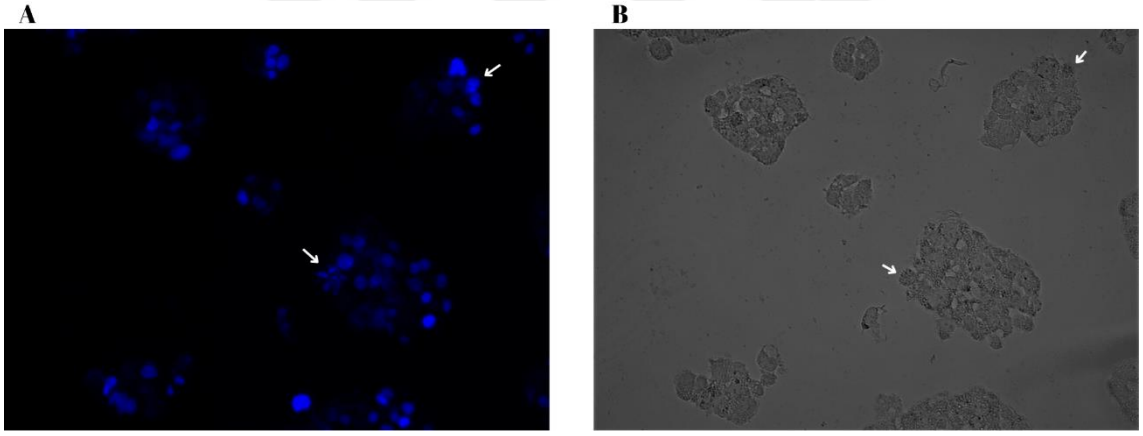
Şekil 4.14. Thle-2 24.saat kontrol grubu
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



Şekil 4.15. Thle-2 48.saat kontrol grubu

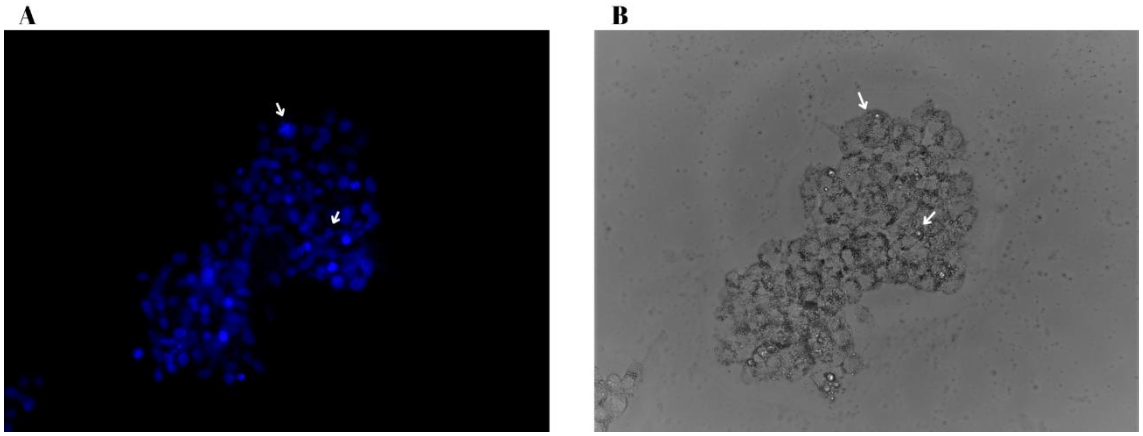
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

Thle-2 hücre hattında deltametrin, asetamiprid ve deltametrin + asetamiprid karışımının DAPI boyamasında ise saatle doğru bir şekilde hücre çekirdeklerinin bozulduğu ve hücre yoğunluğunun azaldığı görülmektedir. Hücre çekirdeğinin bozulduğuna örnekler beyaz ok ile gösterilmiştir.



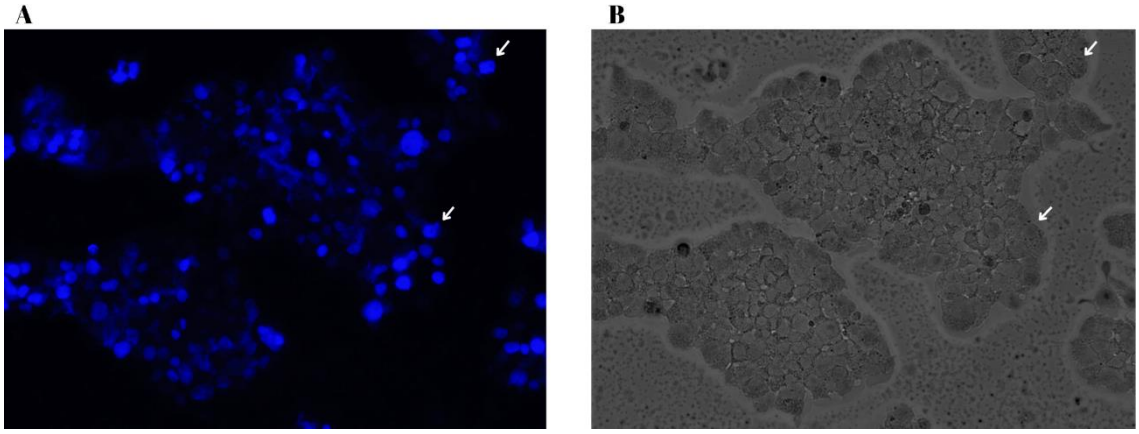
Şekil 4.16. Thle-2 100mM deltametrin 24.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



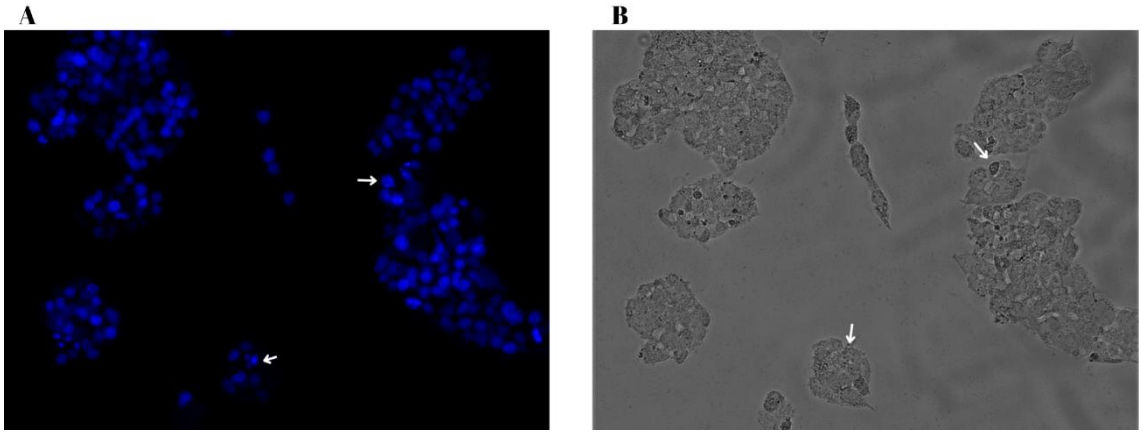
Şekil 4.17. Thle-2 100mM deltametrin 48.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



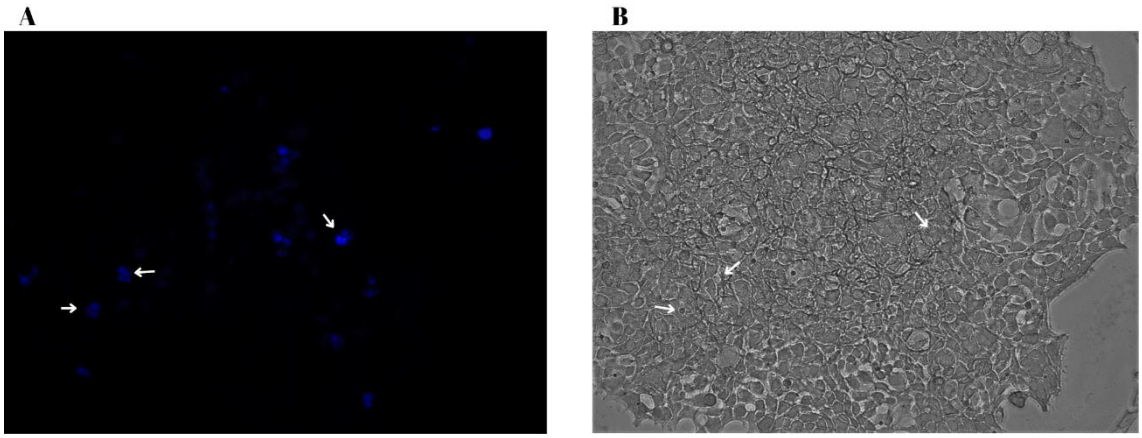
Şekil 4.18. Thle-2 250mM asetamiprid 24.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



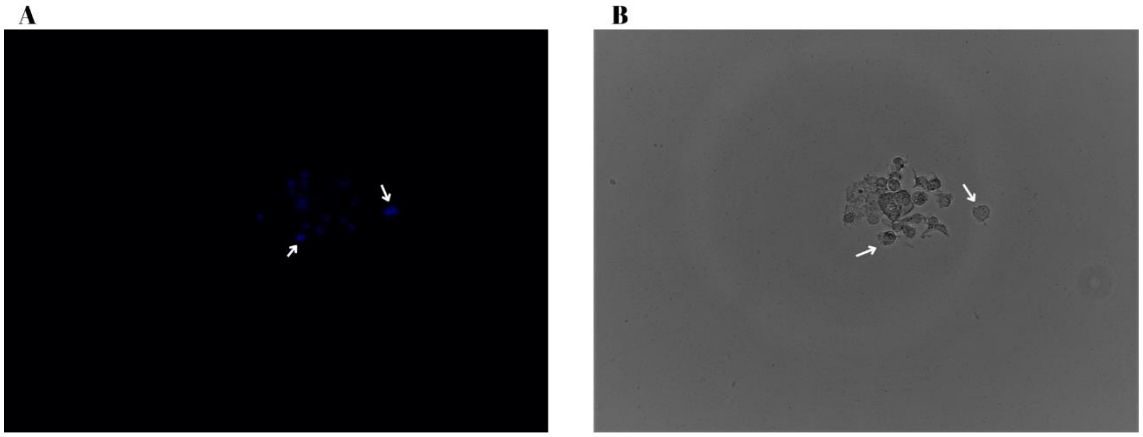
Şekil 4.19. Thle-2 250mM asetamiprid 48.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



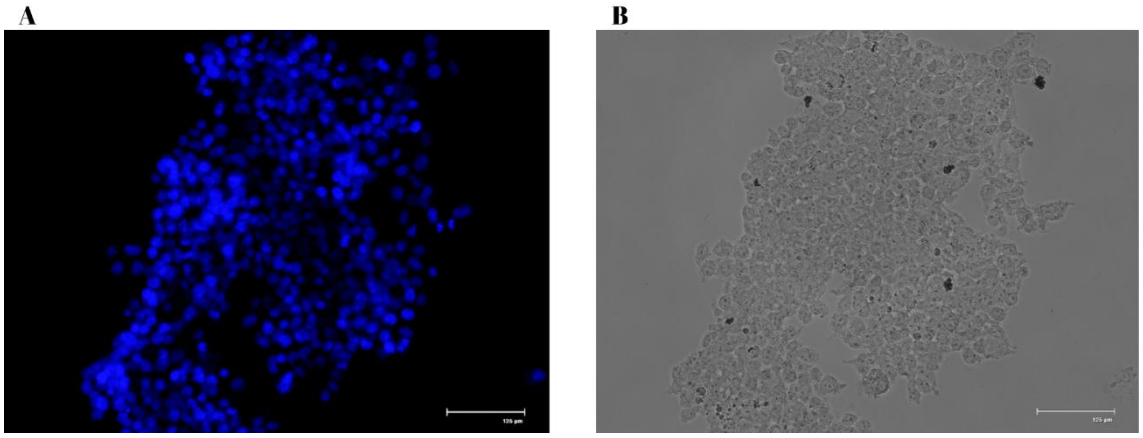
Şekil 4.20. Thle-2 deltametrin (10mM) + asetamiprid (225mM) 24.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

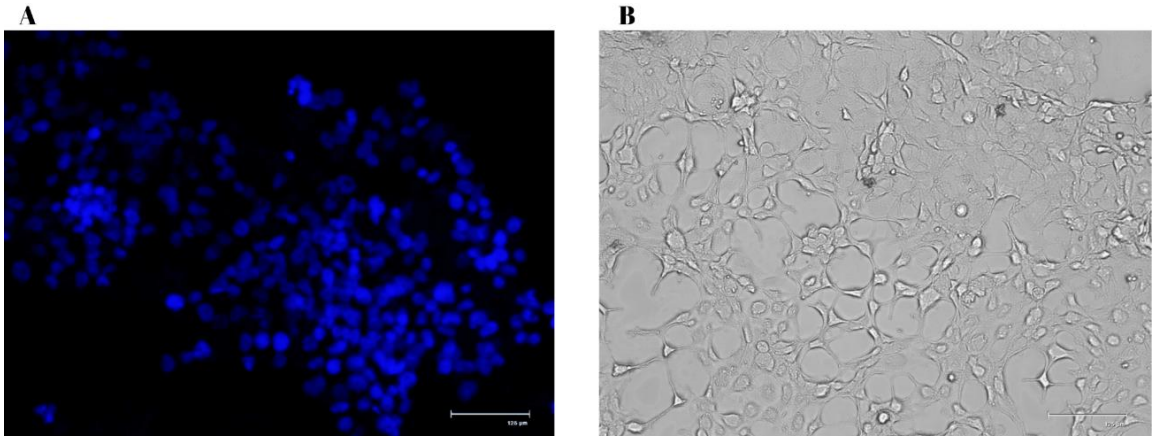


Şekil 4.21. Thle-2 deltametrin (10mM) + asetamiprid (225mM) 48.saat görüntüsü
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

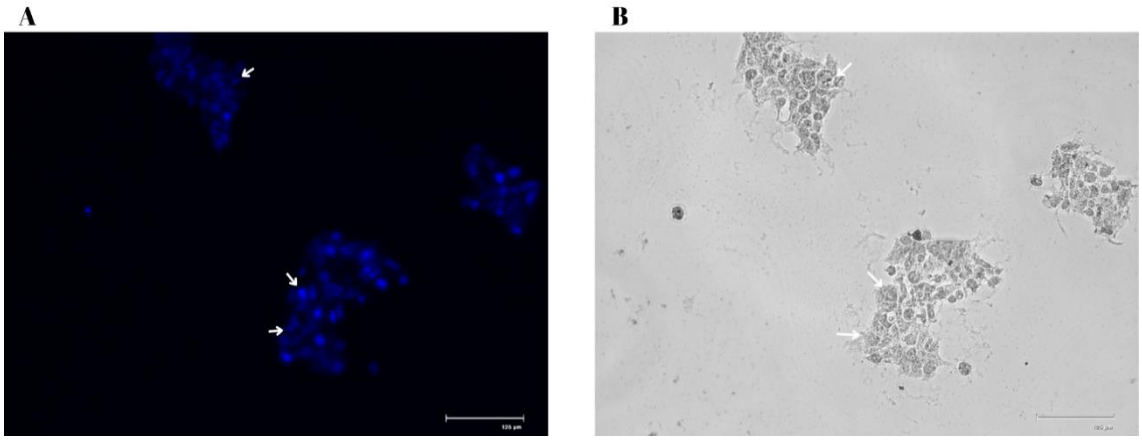
HepG2 hücre hattında da 12 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler, yüzeyin %80'ini kaplayınca belirlenen dozlar uygulanmış ve ardından DAPI boyaması gerçekleşmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin canlılıkları ve yoğunlukları oldukça fazladır. Mavi ışıkta parlak görünen hücreler canlıdır ve boyayı çekirdeğine iyice aldığı görmekteyiz. Dozlu olan hücrelerde ise boyanın daha sönük olduğunu ve hücrelerin morfolojilerinin değişmesi ile çekirdeklerindeki bozulmalarda görülmektedir. Beyaz ok ile gösterilen hücreler bu değişimlere birer örnektir.



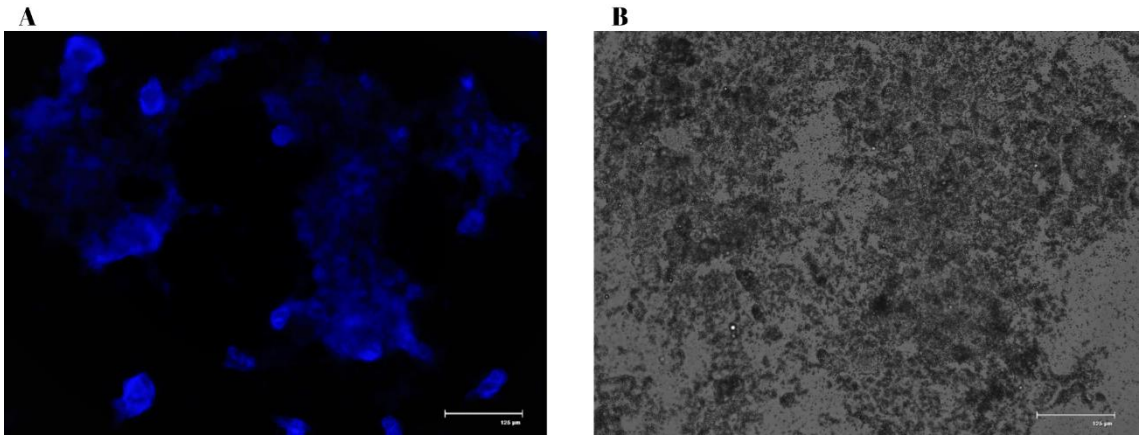
Şekil 4.22. HepG2 24.saat kontrol grubu
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



Şekil 4.23. HepG2 48.saat kontrol grubu
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

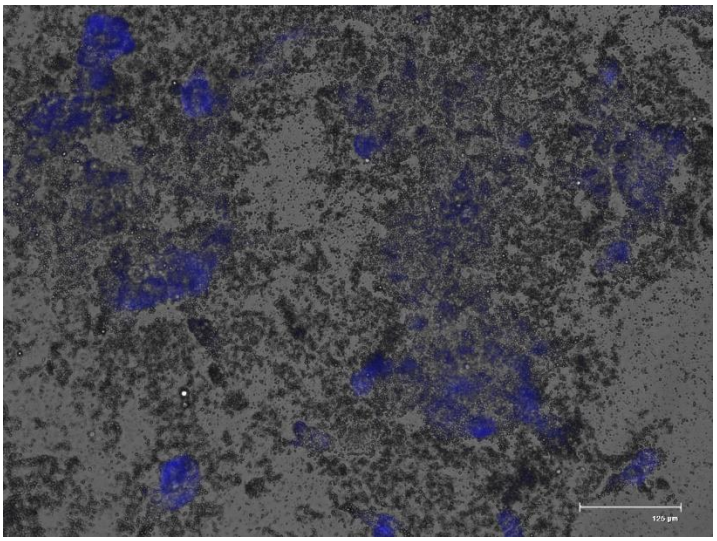


Şekil 4.24. HepG2 710 mM deltametrin 24.saat görüntüsü
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

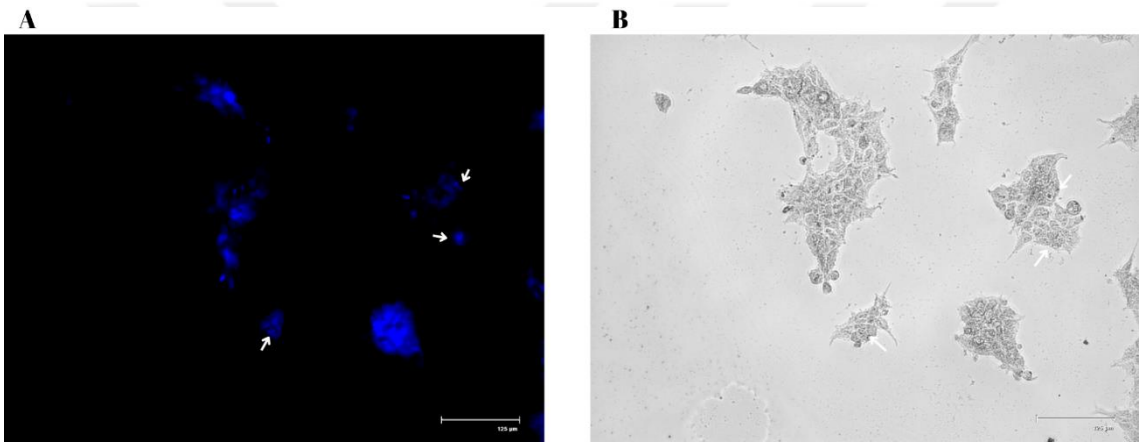


Şekil 4.25. HepG2 710 mM deltametrin 48.saat görüntüsü
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

Deltametrinin 48.saatinde neredeyse tüm hücreler ölmüştür ve boyayı içlerine tam alamamışlardır. Bu sebeple iki görüntü arasındaki anlamı sağlamak amacıyla görüntüler mikroskopta tek bir görüntü olarak kaydedilmişlerdir (Şekil 4.26.).

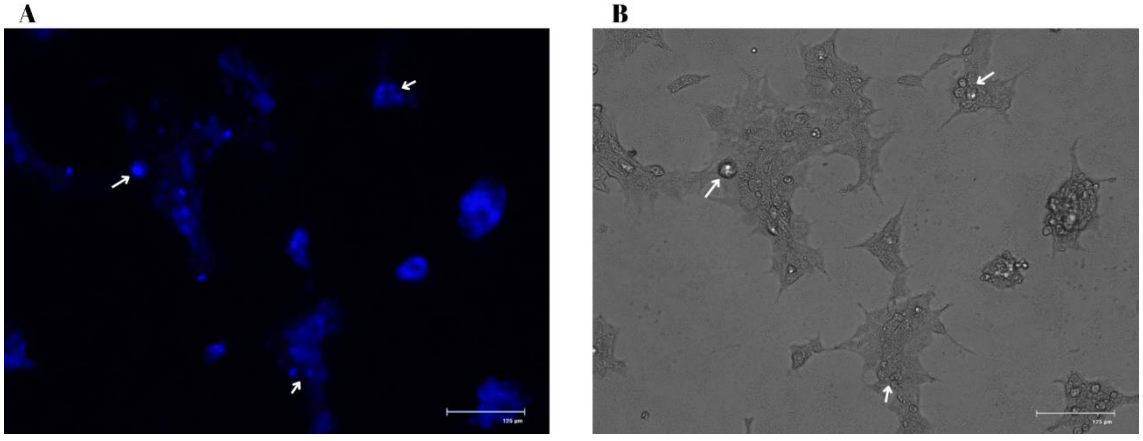


Şekil 4.26. HepG2 710 mM deltametrin 48.saat birleşim görüntüsü



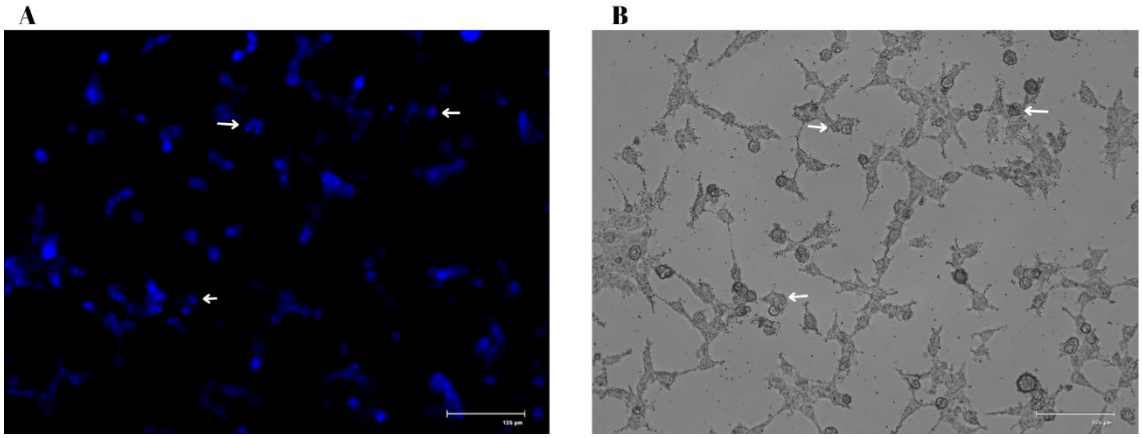
Şekil 4.27. HepG2 asetamiprid 2940 mM 24.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

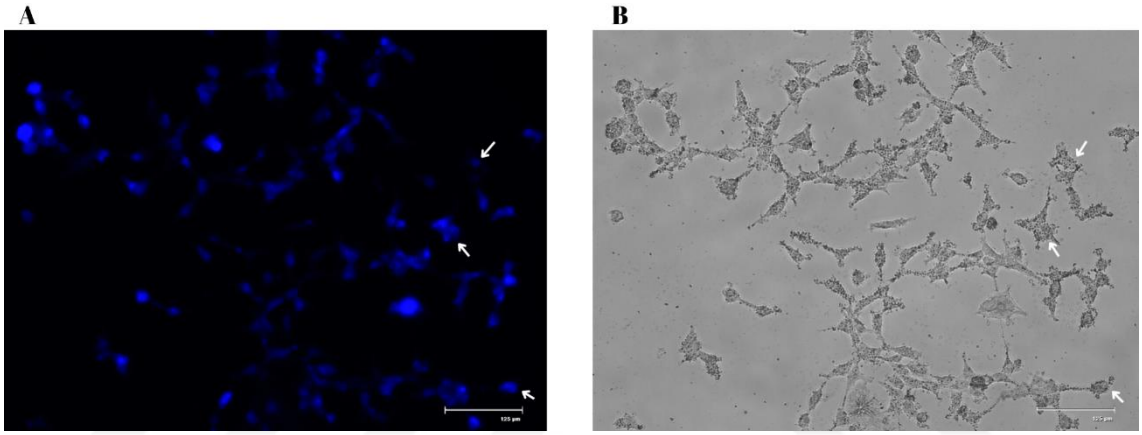


Şekil 4.28. HepG2 asetamiprid 2940 mM 48.saat görüntüsü

A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



Şekil 4.29. HepG2 deltametrin (300 mM) + asetamiprid (500 mM) 24.saat görüntüsü
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık



Şekil 4.30. HepG2 deltametrin (300 mM) + asetamiprid (500 mM) 48.saat görüntüsü
A: Mavi ışık B: Beyaz ışık

4.4. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hattı RNA İzolasyon Sonuçları

Thle-2 ve HepG2 hücrelerinden izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon durumu NanoDrop cihazı ile belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Thle-2 ve HepG2 Hücre Hatlarının RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları

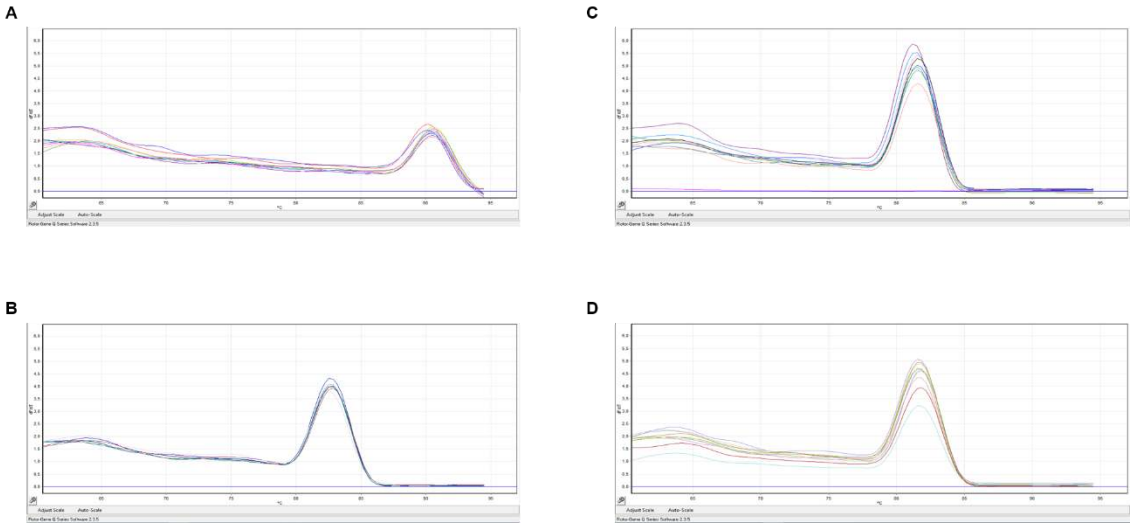
Örnekler	**RNA Konsantrasyonu (ng/µL)**	**$A_{260/280}$**	**$A_{260/230}$**
Thle-2 Kontrol	1445.90	2.02	2.24
HepG2 Kontrol	1699.94	1.99	2.27
Thle-2 100mM DMSO 24.saat	2471.95	1.95	2.19
Thle-2 100mM DMSO 48.saat	2350.87	1.97	2.18
HepG2 710mM DMSO 24.saat	1332.64	2.00	2.23

Tablo 4.1. Devamı

HepG2 710mM DMSO 48.saat	682.58	1.96	2.20
HepG2 2940mM DMSO 24.saat	185.01	1.84	2.11
HepG2 2940mM DMSO 48.saat	523.39	1.97	2.09
Thle-2 100mM Deltametrin 24.saat	1766.50	1.96	2.22
Thle-2 100mM Deltametrin 48.saat	1598.48	1.97	2.23
HepG2 710mM Deltametrin 24.saat	2140.63	1.95	2.20
HepG2 710mM Deltametrin 48.saat	1767.44	1.97	2.22
Thle-2 250mM Asetamiprid 24.saat	1709.11	1.98	2.19
Thle-2 250mM Asetamiprid 48.saat	1603.48	1.98	2.19
HepG2 2940mM Asetamiprid 24.saat	1511.31	1.98	2.22
HepG2 2940mM Asetamiprid 48.saat	839.10	1.97	2.10
Thle-2 10mM Deltametrin + 225mM Asetamiprid 24.saat	2286.84	1.97	2.15
Thle-2 10mM Deltametrin + 225mM Asetamiprid 48.saat	2467.20	1.97	2.12
HepG2 300mM Deltametrin + 500mM Asetamiprid 24.saat	2098.30	1.98	2.20
HepG2 300mM Deltametrin + 500mM Asetamprid 48.saat	1539.85	1.98	2.22

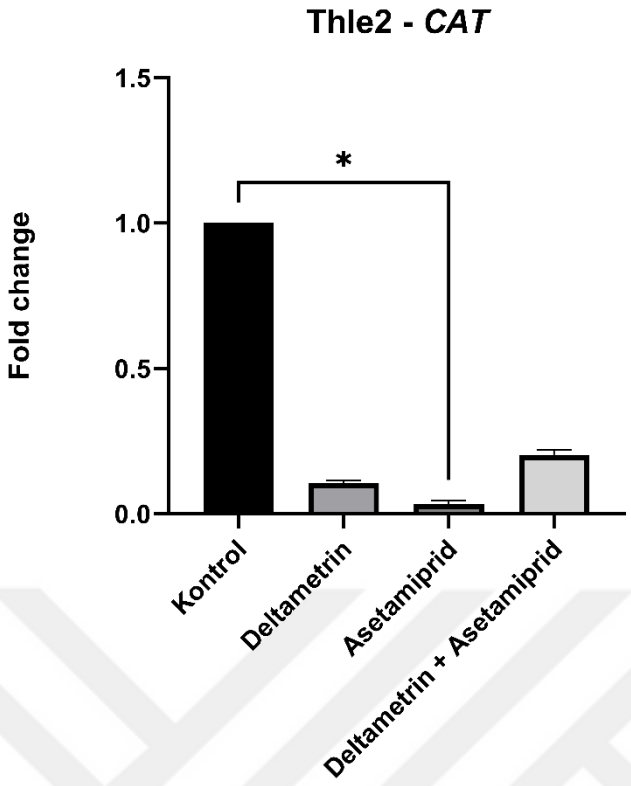
4.5. Thle-2 ve HepG2 Gen Ekspresyon Sonuçları

Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarına uygulanan deltametrin, asetamiprid ve deltametrin+asetamiprid pestisitlerinin antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifadesine etkilerini belirlemek üzere gerçekleştirilen RT-PCR sonuçları Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36 ve Şekil 3.37.'de görüldüğü üzere ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Öncelikle primerlerin kontrolü amacıyla, primerlerin erime eğrileri değerlendirilmiş ve Şekil 4.31.'de görüldüğü gibi her primer çiftinin tek bir ürün verdiği kanıtlanmıştır. Çalıştığımız primerler ile özgül olmayan ürün ya da dimer oluşumu gözlenmemiştir.

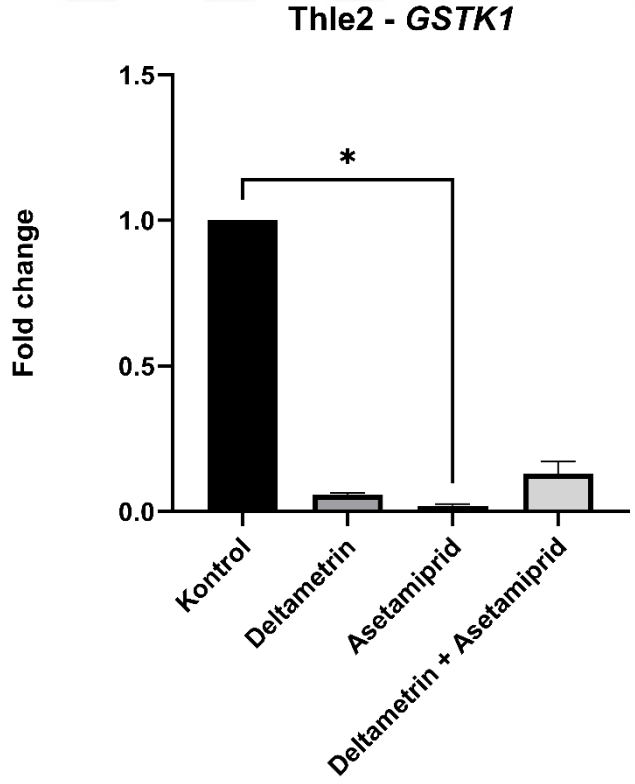


Şekil 4.31. Gen ifadesi ölçümü için kullanılan primer çiftlerinin erime eğrileri *ACT* (A), *CAT* (B), *GSTK1* (C) ve *SOD1* (D).

Thle-2 hücre hattında uygulanan pestisit ve karışımlarının ardından katalaz enzimini kodlayan *CAT* geninin ekspresyonundaki değişim Şekil 4.32.'de verilmiştir. *CAT* geninin ifadesi deltametrin, asetamiprid ve deltametrin+asetamiprid kombinasyonu maruziyeti sonrasında azalma gösterirken, asetamiprid maruziyetinin sebep olduğu gen ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($P<0.05$). Benzer bir ekspresyon profili *GSTK1* geni için de elde edilmiş olup, kontrole göre deltametrin, asetamiprid ve deltametrin+asetamiprid kombinasyonu maruziyetinin gen ifadesine azaltmaya sebep olduğu belirlenmiştir. *CAT* geninde olduğu gibi asetamiprid uygulaması sonrası *GSTK1* geninin ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.33.).

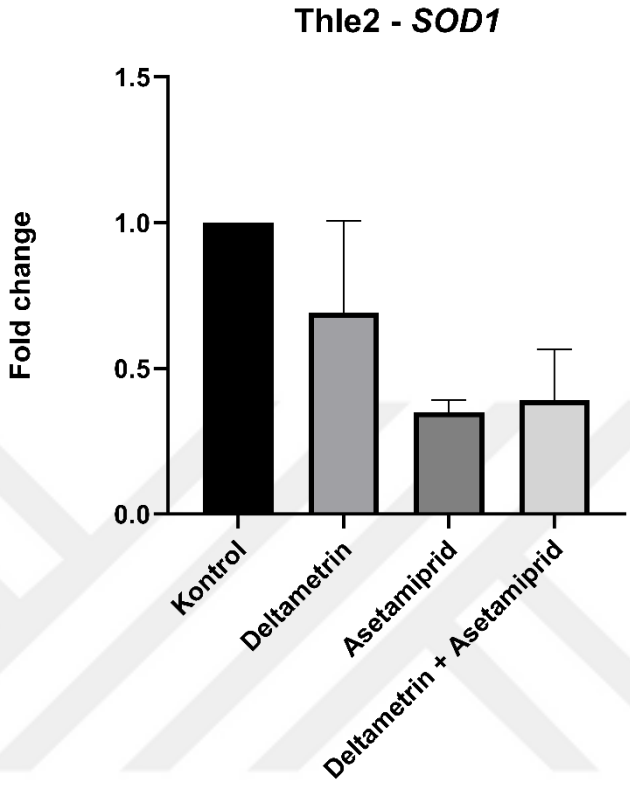


Şekil 4.32. Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *CAT* gen ifadesinin değişimi (* simgesi istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir)



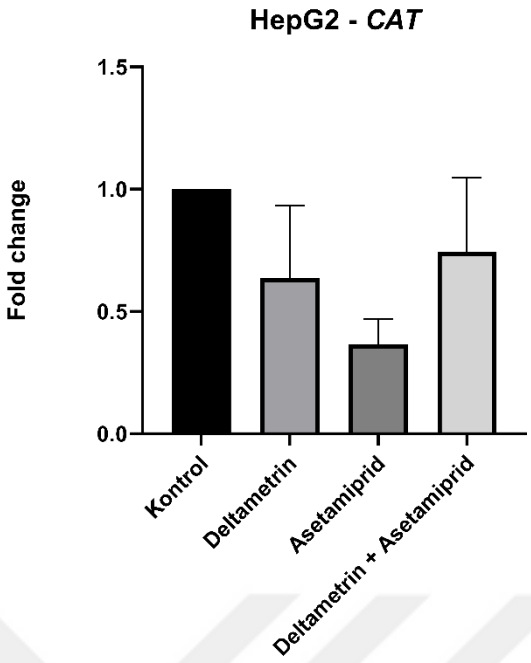
Şekil 4.33. Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *GSTK1* gen ifadesinin değişimi (* simgesi istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir)

Thle-2 hücre hattında *SOD1* gen ifadesinde kontrole göre pestisit uygulanan gruplarda azalma gözlemlenmiş olup, bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.34.).

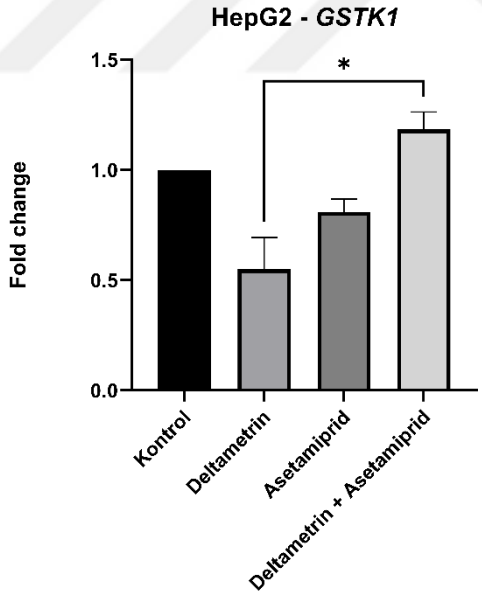


Şekil 4.34. Thle-2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *SOD1* gen ifadesinin değişimi

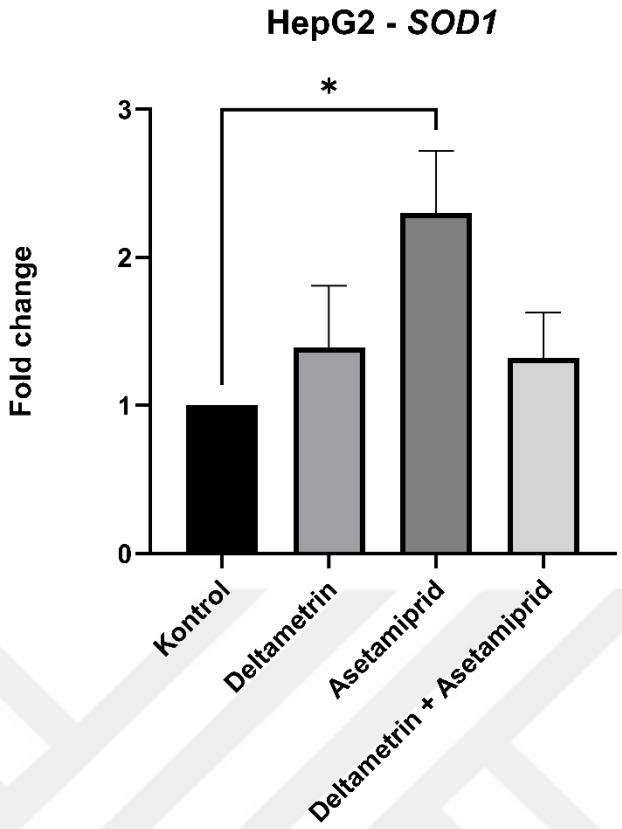
HepG2 hücre hattında *CAT* geninin ifadesi pestisit uygulamaları sonrası azalmıştır ve fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.35.). *GSTK1* geninin ifadesi HepG2 hücre hattında deltametrin ve asetamiprid maruziyetinin ardından azalırken, deltametrin+asetamiprid kombinasyonu maruziyeti sonrası artmıştır (Şekil 4.36.). Bu artış deltametrin uygulanan grup ile kıyaslandığında anlamlı bir fark göstermektedir ($P<0.05$). HepG2 hücre hattında *SOD1* gen ifadesi değişimine bakıldığında ise pestisit maruziyetlerinin genin ifadesini kontrole göre arttırdığı ve bu artışın asetamiprid maruziyetinde anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.37.).



Şekil 4.35. HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *CAT* gen ifadesinin değişimi



Şekil 4.36. HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *GSTK1* gen ifadesinin değişimi (* simgesi istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir)



Şekil 4.37. HepG2 hücre hattında pestisit uygulamaları sonucu *SOD1* gen ifadesinin değişimi (* simgesi istatistiksel anlamlı farkı ifade etmektedir)

4.6. Tartışma

Yapılan çalışmada Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarında deltametrin ve asetamiprid pestisitleri hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanması sonucu sitotoksik, metastatik ve antioksidan genlerin ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada toksik doz değerlerini belirlemek amacıyla yapılan XTT işlemi sonucu uygulanacak dozlar belirlenmiştir. Thle-2 hücresi için; deltametrin 100mM, asetamiprid 250mM ve karışım halinde deltametrin 10mM + asetamiprid 225mM olarak belirlenmiştir. HepG2 hücresi içinse; deltametrin 710mM, asetamiprid 2940mM ve karışım halinde deltametrin 300mM + asetamiprid 500mM olarak belirlenmiştir. Thle-2 hücresinde toksik olan dozlar HepG2 hücresinde de denenmiş ve hücreleri öldürmek yerine daha fazla üremelerine sebep olmuştur. Bunun sebebi olarak, HepG2 hücre hattının bir karaciğer kanseri hücre hattı olması düşünülmektedir. HepG2 hücresi için belirlenen dozlarda ise sitotoksik ve morfolojik etkilerinin yoğun olduğu gözlenmiştir. Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarında deltametrin pestisitin 24. saatinde, asetamiprid pestisitinin ise 48. saatinde hücrelerin

büyük çoğunluğunun tabandaki ekstraselüler matrikslerinin uzaklaştığı ve hücrelerin besiyerinde yüzdükleri gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattında deltametrinin 72. saatinde çok fazla hücre ölümüne rastlandığı için çalışmalarda 24. ve 48. saatlerin etkilerine bakılmıştır. Dolayısıyla, bu sonuçlar deltametrinin asetamipridden daha güçlü toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca pestisitlerin birlikte verildikleri karışımda da deltametrinin daha düşük dozda karışıma dahil olması da bu sonuca kanıt niteliğindedir. Ancak bu sonuçlar kullanılan hücre hatlarına ve diğer deney koşullarına bağlı olarak değişebilir. Bu tezde ilk defa kombine halinde kullanılan deltametrin ve asetamiprid pestileri, başka çalışmalarda farklı pestisitler ile kombine halde kullanılmışlardır. Thiakloprid (THİA) ile kullanılan deltametrin, tarım alanında yaygın olan bir insektisit formülasyondur. Antioksidan enzim seviyelerinin düşünmesine, serbest radikallerin oluşmasına ve oksidatif strese neden olan deltametrin, bir o kadar daha kuvvetli pestisit olan ve DNA hasarına yol açan thiakloprid ile kullanılması durumunda hücrede istenmeyen koşullara maruz kalınmıştır. İnsan karaciğer fibroblast hücrelerinde (WHTBF-6) hücre canlılığı ve oksidatif stres etkisi incelenmiştir. Çalışmada 32 μM deltametrin + 481 μM thiakloprid IC_{50} değer olarak belirlenmiştir. Belirlenen doz daha sonra, WHTBF-6 hücresinin malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) seviyeleri belirlemek için uygulanmıştır. Bu karışımın malondialdehit miktarını arttırırken glutatyon seviyesini düşürdüğü belirlenmiş ve böylece hücreyi oksidatif strese maruz bıraktıkları ortaya koyulmuştur (Karabıyık, 2019). Zebra balıkları üzerinde deltametrin ve kurşun gibi toksik maddeler tek başlarına ve kombinasyon halinde maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak *SOD*, *GPx*, lipid peroksidasyonu ve MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir (Paduraru ve ark., 2021). İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattında toksik etkileri değerlendirilen asetamiprid ve imidakloprid, tek başlarına kullanımlarının karışım olarak kullanılmasından daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Düşük dozlarda bile etkili olan asetamiprid ve imidakloprid karışımı, mitokondriyal membran depolarizasyonuna, DNA hasarına ve oksidatif strese sebep olmuştur (Baysal, 2022). Literatürde daha çok pestisitlerin, bitkiler üzerindeki toksisitesinin değerlendirildiği çalışmalara rastlanılmıştır. Fakat bu tez ve tezde bahsedilen diğer çalışmalar gibi hücre hatlarında veya model organizmlar üzerinde de çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle karışım toksisitesi dikkate alınmalıdır.

Migrasyon deneylerinde ise her iki pestisit, hücrelerde hareket etme kabiliyetlerinde azalmaya sebep olduğu görülmüştür. İki hücre hattında da deltametrinin hücrelerde morfolojik bozulmaya ve açılan yara alanının genişlediği belirlenmiştir. Bu

etkiler asetamiprid de görülmüş ama daha düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. İki pestisitin karışımının kullanıldığı zaman ise iki hücre hattında da büyük ölümler gözlenmiştir. Buradan pestisit kombinasyonlarının birbirlerinin etkilerini arttırdıkları belirlenmiştir. Canlıların birden fazla pestisite aynı anda maruz kalma risklerinin çok fazla olduğundan dolayı bu veriler oldukça önemlidir.

Yapılan çalışmalar kapsamında karaciğer, deltametrin metabolizmasında ana bölge olduğu tespit edilmiştir (Gündüz ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında kullanılan iki hücre hattı da karaciğer hücresinin farklı formalarından olsa da, deltametrinin asetamipride göre daha büyük hasara neden olmasının sebeplerinden biri olabilir. Deltametrinin karaciğer hücreleri üzerinde yapılan çalışmada 1µM, 10µM ve 100µM dozlara, 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldıktan sonra tüm doz ve saat arasındaki oranların önemli bir toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Gacar, 2016). Bu toksik etkiler bakımından oksidatif reaksiyonlar ve apoptotik hücre ölümleri arasındaki bağ açığa çıkarılmış olmasına rağmen *SOD*, *CAT* ve *GSTK1* genlerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan bir diğer pestisit olan asetamiprid de insanlar için sitotoksik olduğu ve oksidatif dengesizliğe yol açıp protein hasarlarına neden olduğu bildirilmiştir (Gomez ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar daha çok üreme sistemi üzerine olup hormonal bozulmalar ve apoptoz ile ilişkili olduğu raporlanmıştır (Arıcan ve ark., 2020). Karaciğer üzerinde yapılan çalışmalarında ise mikronükleus çift zincir DNA kırıklarının oluşumu gözlenmiştir (Çavaş ve ark., 2014). Ancak her iki pestisitinde Thle-2 ve HepG2 hücre hatlarında bir çalışmaya rastlanılmamış ve özellikle farklı insektisit gruplarından olan bu iki pestisitin karışımı ilk kez kullanılmıştır.

Thle-2 ve HepG2 hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmada, *CAT*, *GSTK1* ve *SOD1* genlerinin gen ifade seviyeleri incelenmiştir. Referans gen olarak β-actin kullanılan çalışmada, tüm genlerin kontrole kıyasla azalma görüldüğü Thle-2 hücresinde, oksidatif hasarın gerçekleşebileceği gözlenmiştir. Asetamiprid maruziyeti sonrası özellikle *CAT* ve *GSTK1* genlerindeki anlamlı azalmalar, hücrelerin aşırı strese girmesi sonucu serbest radikallerin temizlenemediğini düşündürtmüştür. HepG2 hücre hattında ise *CAT* ve *GSTK1* gen ifadelerinde azalmalar görülse dahi anlamlı bir değere ulaşmamıştır. Fakat *SOD1* gen ifadesindeki artış, diğer yapılan deneylerde değerlendirildiğinde beklenen bir durum olmuştur. Bunun sebebi ise, tezde yapılan tüm deneylerde kanser hücresi olan HepG2'nin, normal karaciğer hücresi için uygulanan dozlarda bir çoğalma göstermesinden kaynaklanmaktadır. Serbest radikallere karşı en önemli antioksidanlardan olan *SOD1* geninin ifadesinin artması, hücrenin strese

girdiğinin ve oksidatif hasardan *SOD1* geni ile korunduğunun göstergesidir. Ancak bu durum kanser hücreleri için istenen bir özellik değildir.

Ağır metallere maruz bırakılan buğday ve arpa bitkilerininde antioksidan enzimlerinin ekspersyon seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmadaki tüm gruplarda *CAT* ve *GPx* enzimlerinin gen ifadeleri artarken, *SOD* enziminin bazı gruplarında gen ifadesinde azalma gözlenmiştir. Genlerdeki bu artış strese bağlı olduğu gösterilmiştir (Yıldır, 2018). İnsanlarda kalıcı hasara neden olan ağır metallerden biri olan kadmiyum üzerinde de *SOD*, *CAT* ve *GSH* gen ifadeleri incelenmiştir. Çalışmada model olarak kullanılan *Drosophila melanogaster*'de antioksidan gen ifadelerinin jenerasyon ilerledikçe azaldığı görülmüştür. Bu durum antioksidan genlerinin baskılanarak etkin çalışamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür (Öngören, 2016).

Bir fungusit olan ziram, *Daphnia magna* neotatlarına uygulanmış ve antioksidan gen ifadeleri araştırılmıştır. Organizmayı oksidatif strese karşı koruyabilmek için süperoksit anyonu ve hidrojen peroksidin hücrelerden uzaklaştırılması gerekmektedir. İlk başta süperoksid radikalinin *SOD* geni tarafından hidrojen peroksite, daha sonra hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşebilmesi için *CAT* genine ihtiyaç vardır. Bu iki enzim stres koşullarında aktivitelerini arttırdığı, aşırı stres koşullarında ise aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (Aksakal, 2020). Başka çalışmalarda da çeşitli pestisitlere maruziyetin *CAT* geninin ifadesini arttıdığı raporlanmıştır (Cui ve ark., 2017; Qi ve ark., 2018). Ayrıca çalışmada *SOD* aktivitesinin, yüksek ziram konsantrasyonu içeren örneklerinde azalma görülmüştür. Bu durum hücrenin aşırı strese girmesinden kaynaklandığı ve yapısında da bozulmaların görüldüğü bildirilmiştir (Aksakal, 2020). Çalışmada kullanılan Thle-2 hücresinde, her iki pestisitin maruziyeti sonucunda *CAT*, *GSTK1* ve *SOD1* genlerinin ifadesinde azalma görülmesi hücrenin aşırı strese girmesinin nedenlerindendir. Bu doğrultuda hücrenin yapısının bozulabileceği ve çeşitli hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir. HepG2 hücresinde ise bu durum tam tersidir. *SOD1* genindeki ifadenin artması, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dönüştürdüğü ama *CAT* geninin ifadesindeki azalma değerlendirildiğinde hidrojen peroksitlerin yeteri kadar su ve oksijene dönüşemediğini göstermektedir. *GSTK1* genin ifadesinin artmasıda, sentetik konjugasyon reaksiyonlarının katalizlendiği ve hücrenin oksidatif strese karşı korunduğunun göstergesidir. Her ne kadar *CAT* genindeki ifade azalmış olsada *SOD1* ve *GSTK1* geninlerinde ifadenin artmasından dolayı HepG2 hücresinin oksidatif strese karşı korunduğu düşünülmektedir. Özetle, pestisitlerin normal hücrelerimiz için zararlı olduğu

ama kanser hücrelerinde faydalı olduğu gözlenmiş olup, deltametrin ve asetamiprid pestisitlerinin kansere veya diğer hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, deltametrin pestisitinin asetamiprid pestisitine göre, normal karaciğer hücresi (Thle-2) ve karaciğer kanser hücresinde (HepG2) daha güçlü toksik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Pestisitlerin kombinasyonlarının uygulandığı durumda yine deltametrinin, asetamipridin sitotoksik etkisini arttırarak hücrelerin morfolojilerinin değiştiği ve çoğalma yeteneklerini kaybettikleri görülmüştür. Ayrıca gen ifadelerindeki artış ve azalış hücre tipine ve bakılan gene göre değişiklik göstermektedir. Genellikle pestisit kombinasyonlarının, araştırılan tüm genlerin ifadesinde tekli madde maruziyetine oranla bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum birden çok pestiside maruz kalınılması halinde hücrelerin aşırı strese girmesi ve uyarılması ile açıklanabilir. Thle-2 hücresinin *CAT*, *GSTK1* ve *SOD1* genlerinde en düşük ifadeye sebep olan asetamiprid pestisiti iken, HepG2 hücresinin *SOD1* geninde anlamlı bir ifade artışına sebep olmuştur. Reaktif oksijen türlerine karşı en önemli antioksidan olan *SOD1*, lipid peroksidayonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin inhibe edilmesinde büyük rol oynamaktadır. Bu sebeple kanser hücresinde daha çok ifade edilebileceği düşünülsede, daha fazla çalışmaların yapılması gerekmetedir. Bu tez, pestisitlerin tek başlarına ve kombinasyonlarının toksik etkilerini anlamak için bir ön çalışma niteliğindedir. İleriki çalışmalarda farklı hücre hatlarında veya hayvan modellerinde, oksidatif stresin daha net anlaşılabilmesi için MDA seviyelerin değerlendirilmesinde ve hala kullanımda olan pestisitlerin tekrardan değerlendirilmesinde büyük katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

Abou-Zeid, S. M., Aljuaydi, S. H., AbuBakr, H. O., Tahoun, E. A., Di Cerbo, A., Alagawany, M., ... & Farag, M. R. (2021). Astaxanthin mitigates thiacloprid-induced liver injury and immunotoxicity in male rats. *Marine drugs*, 19(9), 525.

Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlledsynthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739), 615-616.

Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları, Konya*, 1, 57-63.

Aksakal, F. İ. (2020). Ziram'ın Daphnia magna Straus üzerine toksik etkisinin, antioksidan enzim aktivitesi ve antioksidan sistemle ilişkili genlerin ekspresyonu kullanılarak değerlendirilmesi: araştırma makalesi. GÜFBED/*GUSTIJ* (2021) 11 (1): 11-18. DOI: 10.17714/gumusfenbil.725005

Alavanja, M. C., & Bonner, M. R. (2012). Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(4), 238-263.

Al-Omar, M. A., Beedham, C., & Alsarra, I. A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 12(1), 1-18.

Altıkat, A., Turan, T., Ekmekyapar Torun, F. & Bingül, Z. (2009). Türkiye'de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40 (2), 87-92.

Anand, S. S., Bruckner, J. V., Haines, W. T., Muralidhara, S., Fisher, J. W., & Padilla, S. (2006). Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(2), 156-166.

Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Fernandez-Cruz, M. L., Diaz, M. J., Fernandez, M. C., & Martinez, M. A. (1996). Toxicokinetics of deltamethrin and its 4′-HO-metabolite in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(1), 8-16.

Anderson, J. C., & Dubetz, C. P. Palace. V. P. (2015). Neonicotinoids in the Canadian Aquatic Environment: A Literature Review on Current Use Products with a Focus on Fate, Exposure, and Biological Effects. *Science of The Total Environment*, 505, 409-422.

Arfat, Y., Mahmood, N., Tahir, M. U., Rashid, M., Anjum, S., Zhao, F., Li, D.-J., Sun, Y.-L., Hu, L., Zhihao, C., Yin, C., Shang, P., & Qian, A.-R. (2014). Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports*, *1*. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.08.004

Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., ... & Yılmaz, B. (2019). The role of antioxidant enzymes in oxidative stress-superoxide dismutase

(*SOD*), catalase (*CAT*) and glutathione peroxidase (*GPx*). *Med J SDU*, 26(3), 362-369.

Ata, F. K. (2020). *Annona muricata Bitki Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hattında ve Drosophila melanogaster Model Organizma Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 105s.

Avcı, E. C. (2013). *Deltametrinin Pelophylax ridibundus Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Eritrosit Mikronukleus Testi ile Belirlenmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 169s.

Axley, P., Ahmed, Z., Ravi, S., & Singal, A. K. (2018). Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: a narrative review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6(1), 79.

Badawy, M. E., Ismail, A. M., & Ibrahim, A. I. (2019). Quantitative analysis of acetamiprid and imidacloprid residues in tomato fruits under greenhouse conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(11), 898-905.

Baldi, I., & Lebailly, P. (2007). Cancers et pesticides [Cancers and pesticides]. *La Revue du praticien*, 57(11 Suppl), 40–44.

Baran, B., & Karasu, Z. (2019). Karaciğer sirozu ve komplikasyonları. Erişim linki: https://www.tkad.org.tr/2019/10/karaciger-sirozu-ve-komplikasyonlari.pdf, Erişim tarihi: 09.07.2023.

Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşimlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.

Baysal, M. (2022). İmidakloprid ve Asetamipridin *İn Vitro* Sistemler Üzerindeki Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 146s.

Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1). https://doi.org/10.1289/ehp.9023

Bhunya, S. P., & Pati, P. C. (1990). Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis*, 5(3), 229-232.

Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3). https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2

Bolognesi, C., Carrasquilla, G., Volpi, S., Solomon, K. R., & Marshall, E. J. P. (2009). Biomonitoring of Genotoxic Risk in Agricultural Workers from Five Colombian Regions: Association to Occupational Exposure to Glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(15-16). https://doi.org/10.1080/15287390902929741

Brunet, J. L., Badiou, A., & Belzunces, L. P. (2005). In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, Apis mellifera L. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(8), 742-748.

Budak, R. (2022). *Pirolokinolin kinon'un hepg2 hücre hattı üzerindeki inflamatuar etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 59s.

Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2). https://doi.org/10.1093/mutage/gel011

Buttari, B., Profumo, E., Segoni, L., D'Arcangelo, D., Rossi, S., Facchiano, F., ... & Riganò, R. (2014). Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Camp, A. A., Batres, M. A., Williams, W. C., Koethe, R. W., Stoner, K. A., & Lehmann, D. M. (2020). Effects of the neonicotinoid acetamiprid in pollen on Bombus impatiens microcolony development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(12), 2560-2569.

Carmichael, S. L., Yang, W., Roberts, E., Kegley, S. E., Padula, A. M., English, P. B., Lammer, E. J., & Shaw, G. M. (2014). Residential agricultural pesticide exposures and risk of selected congenital heart defects among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Environmental Research*, 135. https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.030

Catinot, R., Hoellinger, H., Sonnier, M., & Pichon, J. (1989). In vitro covalent binding of the pyrethroids cismethrin, cypermethrin and deltamethrin to rat liver homogenate and microsomes. *Archives of Toxicology*, 63, 214-220.

Cengiz, E. İ. (2002). *Çeşitli pestisitlerin subletal derişimlerinin sivrisinek balığının (Gambusia affinis) solungaç, karaciğer ve barsaklarındaki histopatolojisi ve yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkileri*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 122s.

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., ... & Vernet, P. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 2074-2085.

Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni, E., Neffati, F., Bhouri, R., ... & Ben Cheikh, H. (2016). Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 25191-25199.

Chargui, I., Grissa, I., Bensassi, F., Hrira, M. Y., Haouem, S., Haouas, Z., ve 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:BES*, 25(6), 672-683. https://doi.org/10.3967/0895-3988.2012.06.009

Choi, J. M., Oh, S. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, C. S., ... & Kim, S. K. (2015). HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of Pharmacol Research*, 38, 691-704.

Cochrane, C. G. (1991). Cellular injury by oxidants. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S23-S30.

Cole, L. M., Ruzo, L. O., Wood, E. J., & Casida, J. E. (1982). Pyrethroid metabolism: comparative fate in rats of tralomethrin, tralocythrin, deltamethrin, and (1R,. alpha. S)-cis-cypermethrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4), 631-636.

Crawford, M. J., Croucher, A., & Hutson, D. H. (1981). The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science*, 12(4), 399-411.

Cui, F., Chai, T., Qian, L. and Wang, C. (2017). Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of Daphnia magna. Chemosphere, 169, 107-116. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.073

Cüre, E. (2007). *Ratlarda demir yüklenmesi ile oluşturulan oksidatif stresin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterin etkinliğinin araştırılması,* Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, 43s.

Çalışkan, B., Uysal, T. K., Şimşek, E., Özensoy Güler, Ö., Terzi, E., & Öz Bedir, B. E., (2022). *Borik Asidin Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Farklı Etkileri*. IGSCONG'22, 2. Uluslararası Lisansüstü Çalışmalar Kongresi, Turkey.

Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D. (2014). Effects of fullerenol nanoparticles on acetamiprid induced cytoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.008

Çelik, S. H. (2021). *Hepg2 Hücrelerinde Cisplatin Toksikasyonuna Silymarinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 72s.

Çetinkaya Açar, Ö., Metot, D. F. P. A. İ., Açıklamalı, V. V. Ö. B. H., & Rehberi, U. (2015). TC Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı. *Ulusal Gıda Referans laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi, Mayıs 2016_rev3*, 1-55.

Çiftçi, N. (2017). Oksidatif stresin kanserdeki rolü: Antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi. *Ahi Evran Tıp Dergisi*, 1, 8-13.

Devasagayam, T. P., Boloor, K. K., ve Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40(5), 300–308.

Dhouib, I. B., Annabi, A., Doghri, R., Rejeb, I., Dallagi, Y., Bdiri, Y., ... & Gati, A. (2017). Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological, and behavioral changes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 27515-27524.

Dich, J., Zahm, S. H., Hanberg, A., & Adami, H. O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes & Control*, 8, 420-443.

Dobrian, A. D., Davies, M. J., Schriver, S. D., Lauterio, T. J., & Prewitt, R. L. (2001). Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*, 37(2), 554-560.

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR), Hernandez Jerez, A., Adriaanse, P., Berny, P., Coja, T., Duquesne, S., ... & Aldrich, A. (2022). Statement on the active substance acetamiprid. *Efsa Journal*, 20(1), e07031.

El-Gohary, M., Awara, W. M., Nassar, S., & Hawas, S. (1999). Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*, 132(1), 1-8.

Elliot, M. (1980). Established pyrethroids. *Pesticide Science*, 11, 119-128.

Eriksson, P., & Fredriksson, A. (1991). Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(1), 78-85.

Ersoy, N., Tatlı, Ö., Evcil, E., Çoşkun, L. Ş., Özcan, S., & Erdoğan, E. (2011). Sert çekirdekli ve sert kabuklu meyve türlerinde bazı pestisit kalıntıları. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 25(1), 75-83.

Ersoy, N., Tatlı, Ö., Özcan, S., Evcil, E., Çoşkun, L. Ş., Erdoğan, E., & Keskin, G. (2011). Üzüm ve çilekte pestisit kalıntılarının LC-MS/MS ve GC-MS ile belirlenmesi. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 25(2), 70-80.

Ertürk, B. (2019). *Deltametrin ve thiakloprid karışımının insan akciğer hücrelerindeki sitotoksisitesi ve DNA çift zincir kırıkları üzerindeki etkileri,* Doktora Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 110s.

Everett, C. J., Medunjanin, D., & Frithsen, I. L. (2018). Chapter 5 - Roles of environmental pollution and pesticides in diabetes and obesity: The epidemiological evidence. Içinde D. Bagchi & S. Nair (Ed.), Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome (Second Edition), Academic Press, USA, 53-64 p.

Fattman, C. L., Schaefer, L. M., & Oury, T. D. (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), 236-256.

Fırat, Ö., & Aytekin, T. (2018). Effect of neonicotinoid insecticide thiamethoxam on oxidative stress parameters in Oreochromis niloticus. *Journal of Balikesir University Institute of Science and Technology*, 20(2), 224-234.

Fıtzhugh, O. G., & Nelson, A. A. (1947). The chronic oral toxicity of DDT (2,2-bis(p-chlorophenyl-1,1,1-trichloroethane). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 89(1), 18–30.

Ford, K. A., & Casida, J. E. (2006). Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 19(7), 944-951.

Forshaw, P. J., & Bradbury, J. E. (1983). Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. *European Journal of Pharmacology*, 91(2-3), 207-213.

Fridovich, I. (2011). Oxidative Stress. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group. 2001;1-5.

Gacar, A. (2016). *Sıçan primer karaçiğer hücre kültürü üzerine deltametrinin apoptotik ve oksidatif etkilerinin incelenmesi,* Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 86s.

Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M. A., Villalobos-Pietrini, R., & De León-Rodríguez, J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466(1). https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00231-4

Gomez, S. D., Bustos, P. S., Sánchez, V. G., Ortega, M. G., & Guiñazú, N. (2020). Trophoblast toxicity of the neonicotinoid insecticide acetamiprid and an acetamiprid-based formulation. Toxicology, 431, 152363. https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152363

González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., & Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19(7). https://doi.org/10.1007/s10646-010-0508-x

Göktaş, Ö. (2007). *Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine resveratrolün koruyucu etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 72s.

Güleş, Ö., ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.

Gündüz, E., Ülger, B.V., İbiloğlu, İ., Ekinci, A., Dursun, R., Zengin, Y., İçer, M., Uslukaya, M., Ekinci, C., & Güloğlu, C. (2015). Glutamine Provides Effective Protection Aganist Deltamethrin-Induced Acute Hepatotoxicity in Rats But Not

Aganist Nephrotoxicity. *Medical Science Monitor,* 21, 1107-1114. https://doi.org/10.12659/MSM.893180

Güvenalp, N., & Güvenç, D. (2020). An evaluation of the effects of medium pH on the viability of the HepG2 cell line. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(2), 107-114.

Haddad, J. J. (2002). Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-κB. *Critical Care*, 6, 1-10.

Halliwell, B. (1999). gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*.

Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. *e LS*.

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, 587-590.

Heder, A. F., Hirsch-Ernst, K. I., Bauer, D., Kahl, G. F., & Desel, H. (2001). Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, 62(1), 71-79.

Honda, H., Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2006). Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and-aldehyde oxidase systems. *Toxicology Letters*, 161(2), 108-114.

Hoy, J., & Swanson, N. (2015). The High Cost of Pesticides: Human and Animal Diseases. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 03(01). https://doi.org/10.4172/2375-446X.1000132

https://www.atcc.org/products/hb-8065, Son Erişim: 14.06.2023

https://www.ksu.edu.tr/default.aspx?DId=28416. Son Erişim: 11.06.2023.

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.

Ighodaro, O. M. (2017). dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) and glutathione peroxidase (*GPX*): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*.

Imamura, T., Yanagawa, Y., Nishikawa, K., Matsumoto, N., & Sakamoto, T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clinical Toxicology*, 48(8), 851-853.

Innes, J. R., Ulland, B. M., Valerio, M. G., Petrucelli, L., Fishbein, L., Hart, E. R., Pallotta, A. J., Bates, R. R., Falk, H. L., Gart, J. J., Klein, M., Mitchell, I., & Peters, J. (1969). Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. *Journal of the National Cancer Institute*, 42(6), 1101–1114.

İstanbulluoglu, H., & Tekbas, O. F. (2013). Persistent organic pollutants (POPs). *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 70(3). https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2013.49403

Jaga, K., & Dharmani, C. (2005). The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. *Reviews on Environmental Health*, 20(1), 15-38.

Jana-Kara, B. R., Jihullah, W. A., Shahi, B., Dev, V., Curtis, C. F., & Sharma, V. P. (1995). Deltamethrin impregnated bednets against Anopheles minimus transmitted malaria in Assam, India. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(2), 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(7), 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(9), 500-504.

Jungmann G. (1966). Uber den Arsenkrebs bei Winzern [Arsenic cancer in vintagers]. *Der Landarzt*, 42(28), 1244–1247.

Kale, M., Rathore, N., John, S., & Bhatnagar, D. (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters*, 105(3), 197-205.

Kalıpcı, E. (2011). *2, 4-D herbisitleri ve endüstriyel atık sularının ekotoksik etkilerinin azaserin-sıçan modelinde karaciğer ve pankreasta araştırılması,* Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 114s.

Karabıyık, A. (2019). *Deltametrin ve thiakloprid insektisit karışımının insan akciğer fibroblastlarında oksidatif stres potansiyelinin ve hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 72s.

Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E., & Dow, L. E. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 22(5), 259-279.

Kavlock, R., Chernoff, N., Baron, R., Linder, R., Rogers, E., Carver, B., Dilley, J., & 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 deltamethrin'in kan ve beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 69s.

Kaya, Ş. (2019). *İmidakloprid ve asetamiprid'in bağışık yanıt ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 52.

Kaygısız, H. (2003). *Tarımda ilaçlı mücadelenin temel prensipleri*. Hasad Yayıncılık.

Kaymak, G. (2001). *Farklı Dozlarda Deltametrin Ve Kadmiyum Uygulanan Kılıçkuyruk (Xiphophorus Hellerii) Balıklarında Oluşan Oksidatif Stres Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 66s.

Keil, A. P., Daniels, J. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case–control study. *Environmental Health*, 13(1). https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-3

Kızılet, H., & Uysal, H. (2018). Neonikotinoidler ile İnsan Lenfositlerinde Genotoksisitenin Uyarılması. *Cumhuriyet Science Journal*, 39(1), 201-210.

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Toxicologic pathology oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.

Koller, V. J., Fürhacker, M., Nersesyan, A., Mišík, M., Eisenbauer, M., & Knasmueller, S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86(5). https://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8

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. In *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor* (pp. 71-89). Tokyo: Springer Japan.

Kumar, A., Sasmal, D., & Sharma, N. (2015). An insight into deltamethrin induced apoptotic calcium, p53 and oxidative stress signalling pathways. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 7, 25-34.

Kutluer, F., & Çavuşoğlu, K. (2020). Deltametrinin Genotoksik Etkilerine Karşı *Gınko Bıloba* Yaprak Özütünün Koruyucu Rolü. UBAK Uluslararası Bilimler Akademisi, ISBN: 978-605-80174-9-8.

LaFiura, K. M., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., Ostrea, E. M., Matherly, L. H., Taub, J. W., & Ge, Y. (2007). Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatric Blood & Cancer*, 49(5). https://doi.org/10.1002/pbc.21283

Lee, T. H., Kim, W. R., & Poterucha, J. J. (2012). Evaluation of elevated liver enzymes. *Clinics in Liver Disease*, 16(2), 183-198.

Li, P., Ann, J., & Akk, G. (2011). Activation and modulation of human α4β2 nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *Journal of Neuroscience Research*, *89*(8), 1295-1301.

Liver Disease Progression In Hepatitis B And C Viral Infection, 3D Illustration Royalty Free Fotografie A Reklamní Fotografie. Image 83543023. (123rf.com), Son Erişim: 13.06.2023

López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.

Ma, X., Buffler, P. A., Gunier, R. B., Dahl, G., Smith, M. T., Reinier, K., & Reynolds, P. (2002). Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environmental Health Perspectives*, 110(9). https://doi.org/10.1289/ehp.02110955

Manna, S., Bhattacharyya, D., Mandal, T. K., & Das, S. (2005). Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(3), 160.

Marfo, J. T., Fujioka, K., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M., Mizukawa, H., Aoyama, Y., ... & Taira, K. (2015). Relationship between urinary N-desmethyl-acetamiprid and typical symptoms including neurological findings: a prevalence case-control study. *PloS One*, 10(11), e0142172.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 83-95.

Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect Chironomus riparius evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1-2). https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.09.005

Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M. E., Félix-Gastélum, R., & Álvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*, 35(8). https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.010

Marzouki, S., Dhouib, I. B., Benabdessalem, C., Rekik, R., Doghri, R., Maroueni, A., ... & Ahmed, M. B. (2017). Specific immune responses in mice following subchronic exposure to acetamiprid. *Life Sciences*, 188, 10-16.

Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573-580.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free RadicBiol Med*, 5, 363-369.

Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2014). Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International*.

Miao, L., & Clair, D. K. S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344-356.

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.

Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68-78.

Mittler, R. (2002). Trends Plant Sci. *Oxidative stress, Antioxidants and Stress Tolerance*, 7, 405-410.

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.

Narahashi, T. (1991). Transmitter-activated ion channels as the target of chemical agents. *Neuroreceptor Mechanisms in Brain*, 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(3), 194-205.

Nauen, R., ve Jeschke, P. (2011). Basic and applied aspects of neonicotinoid insecticides. *Green Trends in Insect Control*, 1, 132-162.

Nenni, M. (2019). *HepG2, Caco-2 ve HT-29 Kanser Hücrelerinde 2D Jel Elektroforez ve MALDI-TOF/TOF-MS) ile Ankaferd Hemostat'ın in-Vitro Antineoplastik Etkisinin Proteomik Açıdan Araştırılması,* Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 180s.

Nicole, H. P. C., Ivonne, M. C. M. R., & Heleen, W. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defence. *Environ Toxicol Pharmacol*, 10, 141-152.

Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., & Foyer, C. H. (2011). Glutathione. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.

Nordberg, J., & Arnér, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1.

Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12, 913-922.

Öncüer, C. (2000). Tarımsal zararlılarla savaş yöntem ve ilaçları (4. Baskı). *Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları*, (13), 333.

Öngören, G. (2016). Multijenerasyonel Kadmiyum (Cd) Uygulamasına Maruz Kalan *Drosophila melanogaster*'de Bazı Moleküler Yanıtların Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 113s.

Ören, P. (2009). *Malathionun Oreochromis niloticusta oksidatif stres kaynaklı endokrin bozucu etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71s.

Özden, S. (2006). *Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 173s.

Özercan, B., & Taşcı, R. (2022). Türkiye'de Pestisit Kullanımının İller, Bölgeler ve Pestisit Grupları Açısından İncelenmesi. *Ziraat Mühendisliği*, *375*. https://doi.org/10.33724/zm.1120599

Paduraru, E., Flocea, E. I., Lazado, C. C., Simionov, I. A., Nicoara, M., Ciobica, A., Faggio, C., & Jijie, R. (2021). Vitamin C Mitigates Oxidative Stress and Behavioral Impairments Induced by Deltamethrin and Lead Toxicity in Zebrafish. *International journal of molecular sciences*, *22*(23), 12714. https://doi.org/10.3390/ijms222312714

Parantainen, J., Vapaatalo, H., & Hokkanen, E. (1986). Clinical aspects of prostaglandins and leukotrienes in migraine. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*, 6 Suppl 4, 95–101.

Paşalak, Ş. İ., & Seven, M. (2017). Onkolojide genetik gelişmeler ve hemşirenin rollerine etkisi. *Koç Üniversitesi Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi (HEAD*). 14 (3), 212-217.

Pazarbaşı, A., & Kasap, M. (2003). Kanser genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(4).

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89-96.

Phua, D. H., Lin, C. C., Wu, M.-L., Deng, J.-F., & Yang, C.-C. (2009). Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clinical Toxicology*, *47*(4). https://doi.org/10.1080/15563650802644533

Piner, P. (2009). *Lambda-Cyhalothrinin Oreochromis Niloticus' Da Karaciğerde Piperonil Bütoksit Modülatörlüğünde Oksidatif Stres Potansiyelinin Belirlenmesi, Stres Proteinleri Ve Apoptozis Üzerine Etkileri,* Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 102s.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.

Poonam, S., Mysra, J., & Rambir, S. (2013). Deltamethrin toxicity: A review. *Indian Journal of Biological Studies & Research*, 2, 91-107.

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., & Rajini, P. S. (2005). Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 299-306.

Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

Proudfoot, A. T. (2005). Poisoning due to pyrethrins. *Toxicological Reviews*, 24(2), 107-113.

Qi, S., Wang, D. H., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X. and Wu, L. (2018). Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in Daphnia magna. Ecotoxicology and Environmental Safety, 148, 352-358. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.042

Ren, Y., He, X., Yan, X., Yang, Y., Li, Q., Yao, T., ... & Zou, L. (2022). Unravelling the polytoxicology of chlorfenapyr on non-target HepG2 cells: The involvement of mitochondria-mediated programmed cell death and DNA damage. *Molecules*, 27(17), 5722.

Rives, C., Fougerat, A., Ellero-Simatos, S., Loiseau, N., Guillou, H., Gamet-Payrastre, L., & Wahli, W. (2020). Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants. *Biomolecules*, 10(12), 1702.

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1-9.

Rose, P. H. (2012). Nicotine and the neonicotinoids. *Mammalian Toxicology of Insecticides*, 12, 184-220.

Sanders, L. H., Paul, K. C., Howlett, E. H., Lawal, H., Boppana, S., Bronstein, J. M., Ritz, B., & Greenamyre, J. T. (2017). Editor's Highlight: Base Excision Repair Variants and Pesticide Exposure Increase Parkinson's Disease Risk. *Toxicological Sciences*, 158(1). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx086

Sanyal, J., Bandyopadhyay, S. K., Banerjee, T. K., Mukherjee, S. C., Chakraborty, D. P., Ray, B. C., & Rao, V. R. (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 13(2), 129-132.

Satar, S., Seydaoglu, G., Akpinar, A., Sebe, A., Karakoc, E., Gumusay, U., & Gokel, Y. (2009). Trends in acute adult poisoning in a ten-year period in Turkey: factors affecting the hazardous outcome. *Bratisl Lek Listy*, 110(7), 404-411.

Sauer, E., Moro, A. M., Brucker, N., Nascimento, S., Gauer, B., Fracasso, R., ... & Garcia, S. C. (2014). Liver δ-aminolevulinate dehydratase activity is inhibited by neonicotinoids and restored by antioxidant agents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(11), 11676-11690.

Sheets, L. P. (2010). Imidacloprid: a neonicotinoid insecticide. In *Hayes' handbook of pesticide toxicology* (pp. 2055-2064). Academic Press.

Shirzadfar, H., Sheikhi, K., & Meschian, Z. (2019). The epidemiologic study of neonatal jaundice, relation between jaundice and liver and alternative methods to cure jaundice. *Clinical Practice*, 16(3), 1117-1125.

Shona, S. I., El-Aasar, H. M., Zaki, S. M., & Sayed, W. M. (2010). Morphological and morphometric renal changes in the adult albino rat following oral administration of deltamethrin and the possible protective role of vitamin" E". *Journal of Applied Sciences Research*, (April), 280-290.Rose PH. Chapter 6. Nicotine and the Neonicotinoids. Mammalian Toxicology of Insecticides. Issues in Toxicology 2012. p. 184-220.

Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.

Simon-Delso, N. (2015). Worldwide Integrated Assessment of the Impact of Systemic Pesticides on Biodiversity and Ecosystems (WIA).

Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic mechanisms of pyrethroid action. *Ann. Rev. Entomol*, 34, 77.

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., ... & Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

Sulak, M. T., & Yatmaz, H. C. (2012). Removal of textile dyes from aqueous solutions with eco-friendly biosorbent. *Desalination and Water Treatment*, 37(1-3). https://doi.org/10.1080/19443994.2012.661269

Takada, Y., Hachiya, M., Park, S. H., Osawa, Y., Ozawa, T., & Akashi, M. (2002). Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance. *Molecular Cancer Research: MCR*, 1(2), 137-146.

Taşdan, Z. (2021). *Aloe vera ve Cocos nucifera'nın antimikrobiyal, antioksidan ve HepG2 hücre hattı üzerindeki antitümoral etkinliğinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 200s.

Terayama, H., Qu, N., Endo, H., Ito, M., Tsukamoto, H., Umemoto, K., ... & Sakabe, K. (2018). Effect of acetamiprid on the immature murine testes. *International Journal of Environmental Health Research*, 28(6), 683-696.

Thiers, H., Colomb, D., Moulin, G., & Colin, L. (1967). Le cancer cutané arsenical des viticulteurs du Beaujolais [Cutaneous arsenical cancer in viticultivators in Beaujolais]. *Annales de dermatologie et de syphiligraphie*, 94(2), 133-158.

Thompson, D. A., Lehmler, H. J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K. E., ... & Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of

neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(6), 1315-1346.

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 247-268.

Tözün, M., & Akar, G. (2022). Türkiye'de Gıda Numunelerinde Pestisit Kalıntıları Üzerine 2010 Yılı Sonrası Ulusal Literatürün İncelenmesi. *Estüdam Halk Sağlığı Dergisi*, *7*(1). Https://Doi.Org/10.35232/Estudamhsd.968829

TRGM (2021). İklim Değişikliği ve Tarım Değerlendirme Raporu. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarım Reformu Genel Müdürlüğü, Ankara.

TÜİK (2022). Türkiye tarımsal ilaç kullanım miktarları (2006-2020) Türkiye İstatistik Kurumu.

Uysal, M. (1998). Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11, 336-341.

Ünel, F. (2022). *Adli bilimlerin adli toksikoloji alanında yapılan çalışmalarında iş sağlığı ve güvenliği açısından risklerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Tarsus Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 148s.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266, 37-56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

Vural, N. (2005). Toksikoloji.

Yaman, G. (2015). *Enginar Bitkisinde Bulunan Cynarin ve İnülin Polifenollerinin HEP3B Hepatoma Hücre Soyunda Apoptotik ve İnflamatuar Cevaplar Üzerine Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 89s.

Yang, W., Carmichael, S. L., Roberts, E. M., Kegley, S. E., Padula, A. M., English, P. B., & Shaw, G. M. (2014). Residential Agricultural Pesticide Exposures and Risk of Neural Tube Defects and Orofacial Clefts Among Offspring in the San Joaquin Valley of California. *American Journal of Epidemiology*, 179(6). https://doi.org/10.1093/aje/kwt324

Yavuz Kocaman, A. (2007). Acetamiprid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferal lenfositlerindeki in vitro genotoksik etkileri. *İn Vitro*.

Yemişen, E. (2008). *Termal deri yanığında Silmarinin karaciğer üzerine etkisinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137s.

Yeter, O. T. (2007). *Bal örneklerinde asetamiprid kalıntısının ve bozunma ürünün tayini için yöntem geliştirilmesi,* Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 120s.

Yıldır, H. (2018). Buğday (*Triticum aestivum L*). ve Arpa (*Hordeum vulgare L.*) Bitkilerinde Kısa Süreli Ağır Metal Uygulamasının Bazı Antioksidan Enzimlerinin Ekspresyon Seviyeleri ve Lipid Peroksidasyon Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 110s.

Yıldırım, E. (2008). Tarımsal zararlılarla mücadele yöntemleri ve kullanılan ilaçlar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları,* 219.

Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-*SOD* (*SOD1*), Mn-*SOD* (*SOD2*), and EC-*SOD* (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.

Zeren, O., & Yaşarbaş, M. (1989) Tarımsal ilaçların insanlar üzerindeki etkileri. 2. Ulusal Ergonomi Kongresi, Milli Produktivite Merkezi Yayınları, 379, 268-277.

Zhang, Z. W., Sun, J. X., Chen, S. Y., Wu, Y. Q., & He, F. S. (1991). Levels of exposure and biological monitoring of pyrethroids in spraymen. *Occupational and Environmental Medicine*, 48(2), 82-86.

Zhou, W., Yue, M., Liu, Q., Wang, F., Liu, L., Wang, L., ... & Gao, J. (2021). Measuring urinary concentrations of neonicotinoid insecticides by modified solid-phase extraction–ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to human exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 273, 129714.

Wang, T., Ma, M., Chen, C., Yang, X., & Qian, Y. (2021). Three widely used pesticides and their mixtures induced cytotoxicity and apoptosis through the ROS-related caspase pathway in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112162.

World Health Organization. (1990). *Deltamethrin*. World Health Organization.

Wu, D., ve Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health : The Journal Of The National Institute On Alcohol Abuse And Alcoholism*, 27(4), 277–284.

EKLER

EK-1

Tarım ve Orman Bakanlığı'nın Neonikotinoid Grubu Pestisitlerin Yasaklanması ile İlgili Bildirisi

T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

ÇOK İVEDİ
19.12.2018

Sayı :81466379-320.04.02-E.3768012
Konu :Neonicotinoid Grubu Aktif Maddelerin Yasaklanması ve Kısıtlanması Hk.

a. Antepfıstığı, Armut, Biber, Domates (tarla), Elma, Fındık, Hıyar (tarla), Karpuz, Lahana, Marul, Mısır, Nar, Pamuk, Patlıcan (tarla), Şeftali, Tütün ve Zeytin tavsiyelerinin Avrupa Birliği'nde olduğu gibi **19 Aralık 2018** tarihi itibari ile iptal edilmesi ve bu tarih itibari ile bu ürünlerdeki kullanımının ülkemizde sonlandırılması,
b. Avrupa Birliği'nde söz konusu aktif maddenin, **Nisan 2019** tarihine kadar sadece seralarda kullanımının devam edecek olması ve aynı tarih itibari ile Avrupa Birliği'nce yeniden değerlendirme yapılacak olmasına rağmen ülkemizde seradaki kullanımı ve tohum ilacı olarak kullanımının, **Aralık 2019** tarihinde Bakanlığımızca yeniden yapılacak değerlendirmeye kadar devam etmesi,
c. Eski etiketlerle piyasaya arz edilmiş olan bu aktif maddeyi içeren bitki koruma ürünlerinin etiketlerinde firmasınca **07 Mart 2019** tarihine kadar gerekli düzeltmelerin yapılması,
d. Bitki koruma ürünlerinin kullanımı esnasında arı maruziyetlerini önlemek maksadıyla tavsiye kullanımlarına müsaade edilen ürünlerin etiketlerinde ekte Bakanlığımızca belirlenmiş olan " ***Bu ürün arılara çok zehirlidir. Özellikle çok kuru ve rüzgarlı hava koşullarında, ilaçlı tohum uygulaması sırasında ortaya çıkan tozlar sürüklenme ile taşınarak, çevredeki çiçekli bitkiler ve sularda kalıntı oluşturabileceğinden dolayı, arılar ve diğer polinatör böcekler ilaçlı tohum tozlarına maruz kalabilirler. Bu sebeple çok kuru ve rüzgarlı hava koşullarında ilaçlı tohum ekimi yapılmamalıdır. Tozlaşma amacıyla Bombus arısı kullanılan seralarda kullanmayınız.*** " uyarı ifadelerine yer verilmesi kararları alınmıştır.

Bilgi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Dr. Yunus BAYRAM
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.

Dağıtım:
81 İl Müdürlüğüne

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Eskişehir Yolu 9. Km. Lodumlu Mevkii 06800 Çankaya/ Ankara
Tel: (0312) 287 33 60 Faks:

Bilgi için:Mehmet Ali TEKE
Mühendis

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı:	Cansu AYDIN
Uyruğu:	T.C.
Orcid Numarası:	0000-0002-8083- 7163

EĞİTİM BİLGİLERİ	
Lisans	
Üniversite:	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte:	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı:	2021

Tezden Üretilen Makaleler ve Bildiriler

Uluslararası Konferans ve Sempozyumda Sunulan Bildirileri

Ejons International Journal On Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences international refereed and indexed journal. ISBN: 978-625-367-029-0

Yazılan Makaleler, Kitap Bölümleri ve Bildiriler

Cansu Aydın, Selin Özkan Kotiloğlu, Serap Yalçın Azarkan. Investıgatıon of the Cytotoxıc Effects of Deltamethrin and Acetamiprid on the Thle-2 Cell Line. Ejons International Journal On Mathematics, Engineering & Natural Sciences international refereed and indexed journal. ISBN: 978-625-367-029-0. March 16-18, 2023 / Buenos Aires, Argentina

Cansu Aydın, Büşra Alan, Zeki Serin, Selin Ö. Kotiloğlu, Serap Y. Azarkan. Investıgatıon of the Prolıferatıve and Matestatıc Effects of Pyraclostrobın on Human MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. ICAFVP 1st Internatıonal Conference on Agrıculture, Food, Veterınary and Pharmacy Scıences. ISBN: 978-625-6393-12-7. January 18-21, 2023 / Casablanca

Cansu Aydın, Büşra Şentürk, Selin Ö. Kotiloğlu, Serap Y. Azarkan. Cytotoxıc Effects of Fluorene-9-Bısohenol (BPFL) on Human MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. ICAFVP 1st Internatıonal Conference on Agrıculture, Food, Veterınary and Pharmacy Scıences. ISBN: 978-625-6393-12-7. January 18-21, 2023 / Casablanca