



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

FLUMETRİN'İN MCF-7 HÜCRE SOYU ÜZERİNE ETKİLERİ

Simge KARA ERTEKİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Melike ERKAN**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 14.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Melike ERKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Fatma Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Figen ESİN KAYHAN
Marmara Üniversitesi
Fakülte

Doç. Dr. Nüzhet Cenk SESAL
Marmara Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Engin KAPTAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2007-23704 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, piretroid grubu pestisitlerinden biri olan ve akarisit etkinliğe sahip flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik, östrojenik ve genotoksik etkilerinin belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Tüm lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca akademik olarak bilgi ve tecrübeleriyle yol göstermesi yanı sıra manevi olarak hayatımın şekillenmesinde de bana her zaman destek olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melike ERKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve yanımda olan değerli hocam Dr. Öğ. Üy. Selma YAZAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren çok sevgili arkadaşlarım Doç. Dr. Yasemin AYDIN ve Araş Gör. Dr. Banu ORTA-YILMAZ'a, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Nebahat YILDIZBAYRAK'a çok teşekkür ederim.

Birlikte pek çok güzellikler paylaştığımız, en dar zamanlarımda yanımda olan, manevi olarak her zaman destek olan sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Hande ERENŞOY, Araş. Gör. Dr. Gamze ÖZGÜL-ARTUÇ ve Araş. Gör. Egemen UZEL'e çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım en başından beri yanımda olup bana manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman varlıklarıyla bana güç veren sevgili arkadaşlarım Uzm. Bio. Mediha ESER ve Uzm. Bio. Hilal GÜRLER MAIN'e çok teşekkür ederim.

Bu zamana kadar hiçbir zaman sevgisini ve desteğini esirgemeyen aileme özellikle ANNEM'e ve BABAM'a, sabırla her anlamda yanımda olan eşim MEHMET ERTEKİN ve oğlum AHMET ARAS'a da sonsuz teşekkürler.

Haziran 2019

Simge KARA ERTEKİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. PESTİSİTLER	3
2.1.1. Sınıflandırması	3
2.1.2. Tarihçesi	5
2.1.3. Zehirlenmeler	6
2.1.4. Toksisitesi	6
2.1.4.1. Oksidatif strese etki	7
2.1.4.2. Sitotoksik, Genotoksik ve Teratojenik etki	7
2.1.4.3. Endokrin bozucu etki	8
2.1.4.4. Kalıntı sorunu	9
2.2. PİRETROİDLER	10
2.2.1. Sınıflandırması	11
2.2.2. Etki mekanizması	11
2.2.3. Toksisitesi	12
2.3. FLUMETRİN	15
2.3.1. Toksisitesi	17
2.4. APOPTOZ	19
3. MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ	23
3.3. FLUMETRİN VE ÖSTROJEN KONSANTRASYONLARININ AYARLANMASI	24

3.4. SİTOTOKSİSİTE.....	24
3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi.....	24
3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi.....	25
3.5. APOPTOTİK ETKİ	26
3.5.1 Akridin Turuncusu/ Etidyum Bromür (AO/EtBr) Yöntemi	26
3.6. ÖSTROJENİK ETKİ	27
3.6.1 E-Screen yöntemi	27
3.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ.....	28
3.7.1.Total RNA Analizi	28
3.7.2. cDNA dönüşümü	29
3.7.3. Primerlerin Seçilmesi	30
3.7.4. RT-PCR ile mRNA ekspresyonun ölçümü.....	30
3.7.5. $\Delta\Delta CT$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi	32
3.8. GENOTOKSİSİTE	33
3.8.1. Mikronükleus yöntemi.....	33
3.8.2. Komet yöntemi	34
3.9. İSTATİSTİK ANALİZ	35
4. BULGULAR.....	36
4.1.SİTOTOKSİSİTE BULGULARI.....	36
4.1.1. MTT canlılık testi bulguları.....	36
4.1.2. Laktat Dehidrogenaz bulguları	38
4.2. APOPTOTİK ETKİ BULGULARI	39
4.2.1. Akridin Turuncusu/ Etidyum Bromür (AO/EtBr) Yöntemi Bulguları	39
4.3. ÖSTROJENİK ETKİ BULGULARI	45
4.3.1. E-screen yöntemi bulguları.....	45
4.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) BULGULARI.....	47
4.5. GENOTOKSİSİTE BULGULARI	53
4.5.1. Mikronükleus Yöntemi Bulguları.....	53
4.5.2. Komet Testi Bulguları	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ	92

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Flumetrinin kimyasal yapısı (Bissacot ve Vassilieff, 1997).....	16
Şekil 2. 2: Flumetrinin etki mekanizması (Stanneck ve diğ., 2012a)	16
Şekil 2. 3: Flumetrinin metabolizması (Kaneko ve Miyamoto, 2001).....	17
Şekil 2. 4: Apoptoz mekanizmasının ekstrinsik ve intrinsik yolları (Ichim ve Tait, 2016).....	20
Şekil 4. 1: Flumetrinin 24 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,0001).	37
Şekil 4. 2: Flumetrinin 48 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,0001).	37
Şekil 4. 3: Flumetrinin 72 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,05; **:p<0,0001).....	38
Şekil 4. 4: Flumetrinin MCF-7 hücrelerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine etkileri (*:p<0,01; **:p<0,0001).....	39
Şekil 4. 5: Kontrol grubunda AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ▷: erken apoptotik hücreler.	40
Şekil 4. 6: 1µM flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ►: geç apoptotik hücreler.	41
Şekil 4. 7: 10 µM flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ►: geç apoptotik hücreler.	42
Şekil 4. 8: 100 µM flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ▷: erken apoptotik hücreler, ►: geç apoptotik hücreler.	43
Şekil 4. 9: 1000 µM flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ►: geç apoptotik hücreler, ⇨: nekrotik hücreler.	44
Şekil 4. 10: β-östrodiol'ün 144 saat maruziyeti sonrasında MCF-7 hücreleri üzerine proliferatif etkisi (*: p<0,001)	45
Şekil 4. 11: Flumetrinin 144 saat maruziyeti sonrasında MCF-7 hücreleri üzerine kontrole göre proliferatif etkisi (*: p<0,001).....	46

Şekil 4. 12: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde Bcl-2 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (***: $p < 0,001$).....	48
Şekil 4. 13: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde Bax geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (****: $p < 0,0001$, *: $p < 0,05$).	48
Şekil 4. 14: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde p53 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$).....	49
Şekil 4. 15: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde p21 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).....	49
Şekil 4. 16: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde pS2 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).	50
Şekil 4. 17: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde ER- α geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$).....	50
Şekil 4. 18: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde ER- β geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).....	51
Şekil 4. 19: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde PR geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).....	52
Şekil 4. 20: Kontrol grubunda sitokinez bloklı binükleat hücre görünümeleri.....	54
Şekil 4. 21: 1 μ M flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümeleri. MN: mikronükleus, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.....	54
Şekil 4. 22: 10 μ M flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümeleri. MN: mikronükleus, NB: nüklear bud, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.	55
Şekil 4. 23: 100 μ M flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümeleri. MN: mikronükleus, NB: nüklear bud, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.	56
Şekil 4. 24: 1000 μ M flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümeleri. MN: mikronükleus, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.....	57
Şekil 4. 25: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk momenti değerleri (***: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$).....	58
Şekil 4. 26: Kontrol ve deney gruplarında olive kuyruk momenti değerleri (**: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$)	59
Şekil 4. 27: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk DNA %'si değerleri (*: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$)	59
Şekil 4. 28: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk uzunluğu değerleri (**: $p < 0,01$ - ***: $p < 0,001$ -****: $p < 0,0001$).....	60

Şekil 4. 29: Kontrol grubu hücrelerinin komet görüntüsü	61
Şekil 4. 30: H ₂ O ₂ uygulanan pozitif kontrol hücrelerinin komet görüntüsü	62
Şekil 4. 31: 1µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü.....	63
Şekil 4. 32: 10µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü	64
Şekil 4. 33: 100µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü.....	65
Şekil 4. 34: 1000µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü.....	66



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2. 1: Pestisitlerin Küresel Uyum Sistemine (GHS) göre sınıflandırılması (WHO, 2010).....	4
Tablo 2. 2: Pestisitlerin erkek ve kadınlarda endokrin bozucu etkileri (Mehrpour ve diğ., 2014; Bretveld ve diğ., 2006; Ye ve diğ., 2017)	8
Tablo 3. 1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri	30
Tablo 3. 2: Real Time PCR cihazı deney koşulları	32
Tablo 4. 1: Kontrol ve deney gruplarının apoptoz ve nekroz hücre yüzdeleri (kontrole göre *:p<0,01; **:p<0,0001)	40
Tablo 4. 2: Uygulanan flumetrin dozlarının β -östrodiol'e göre belirlenen göreceli proliferatif etkisi (RPE)	46
Tablo 4. 3: Kontrol ve flumetrin uygulanan deney gruplarında mikronükleus, nükleer bud ve nükleer köprü oluşumları (*:p<0,001, **: p< 0,0001, +:p<0,05, ++:p<0,01)	53

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
AO	: Akridin Turuncusu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
CA	: Kromozomal Aberasyon
CAT	: Katalaz
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroethan
DMEM	: Dulbecco Modified Eagle Medium- Dulbecco'nun Modifiye Medyumu
ER α	: Östrojen reseptörü- α
ER β	: Östrojen reseptörü- β
FBS	: Fetal Bovine Serum- f $\ddot{o}$ t $\ddot{a}$ l sığır serumu
EtBr	: Etidyum Bromür
EPA	: Environmental Protection Agency- Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GSH	: Glutasyon-S-transferaz
HCB	: Hekzaklorobenzen
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LMA	: Low Melting Agarose- düşük sıcaklıkta eriyen agaroz
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MCL	: Maximum concentration levels- maksimum konsantrasyon düzeyi
MDA	: Malondealdehit
MN	: Mikronükleus
MRL	: Maximum Residue Limit- maksimum kalıntı limiti
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid
NB	: Nüklear Bud
NK	: Nüklear Köprü
NDI	: Nuclear Division Index-Nüklear bölünme indeksi
NMA	: Normal Melting Agarose- normal derecede eriyen agaroz
NOEC	: No Observed Effect Concentrations-Olumsuz etki tespit edilmeyen konsantrasyon

OD	: Optic Density - optik dansite
PBS	: Phosphate Buffer Saline- fosfat tuzu tamponu
PCR	: Polymerase Chain Reaction- polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Proliferative effect- proliferatif etki
PGR	: progesteron reseptörü
PSA	: penisilin-streptomisin-amfoterin
RT-PCR	: Real time Polymerase Chain Reaction-Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RPE	: Relative proliferative effect- göreceli proliferatif etki
SCE	: Sister Chromatid Exchange, Kardeş Kromatid Değişimi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SRB	: Sülfordamin-B
T3	: Triiyodotironin
T4	: Tiroksin
TCA	: Trikloro asetik asit
WHO	: World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

FLUMETRİN'İN MCF-7 HÜCRE SOYU ÜZERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Simge KARA ERTEKİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Bu çalışma, pestisitlerden piretroid grubuna ait olan flumetrinin MCF-7 hücre soyu üzerinde sitotoksik, apoptotik, genotoksik ve östrojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır

Pestisitler tüm dünyada tarım ve hayvancılıkta olduğu kadar günlük hayatta da oldukça sık kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitler, fizikokimyasal özelliklerine göre rüzgar, yağmur gibi etkenlerle başka yerlere sürüklenmekte ve birçok canlıya ulaşmaktadır. Pestisit gruplarından piretroid insektisitler, diğer grup pestisitlerle karşılaştırıldığında insanlar ve çevre için daha güvenilir olarak belirtildiğinden en yaygın kullanılan grubu oluşturmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda piretroidlerin birçoğunun toksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Flumetrin, tip II piretroidlerden olup, sığır, kuzu, keçi, at ve köpek gibi birçok hayvanda ektoparazitlere karşı kullanılmaktadır. Ayrıca arıcılıkta akarlar karşı da uzun zamandır kullanılmaktadır.

Flumetrinin 0,1µM ve 2000 µM arasında sekiz farklı dozunun hücre canlılığı ve sitotoksisiteye etkisi araştırılmıştır. Bu dozlar arasından seçilen dört farklı doz (1, 10, 100 ve 1000 µM) flumetrinin apoptoz/nekroz oranına etkisi ve apoptotik yolda anahtar rol oynayan genlerin ekspresyon oranları ve genotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca flumetrinin 6 farklı dozunun (10- 0,0001 µM) östrojenle karşılaştırmalı olarak proliferatif etkisi

değerlendirilmiştir. Bu dozlar arasından seçilen 10 µM, 1 µM, 0,1µM dozunda, östrojenle ekspresyonları arttığı bilinen genlerin (ps2, ERα, ERβ ve PGR) ekspresyon oranları araştırılmıştır. Elde edilen veriler flumetrinin doz artışına bağlı olarak oluşan sitotoksik etkileri olduğu, apoptozu arttığı ve genotoksik etkilerin oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca flumetrinin toksik etkilerinin oluşmadığı düşük dozlarda östrojenik etkiler görüldüğü belirlenmiştir.

Haziran 2019, 108 sayfa.

Anahtar kelimeler: Flumetrin, Piretroidler, Pestisit, Apoptoz, Östrojenik etki



SUMMARY

EFFECTS OF FLUMETHRIN ON MCF-7 CELL LINE

Ph.D. THESIS

Simge KARA ERTEKİN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN

This study was performed to determine the cytotoxic, apoptotic, genotoxic and estrogenic effects of flumethrin belonging to the pyrethroid group from the pesticides on MCF-7 cell line.

Pesticides are used frequently in daily life as well as in agriculture and livestock all over the world. Pesticides according to their physicochemical properties, are dragged to other places by factors such as wind and rain and it reaches many living things. Pyrethroid insecticides from pesticide groups are the most commonly used group because they are more reliable for humans and the environment compared to other group pesticides. However, many studies have shown that most of the pyrethroids have toxic effects. Flumethrin is a type II pyrethroid and is used against ectoparasites in many animals such as cattle, lambs, goats, horses and dogs. It has also been used in bee keeping against mites for a long time.

The effect of 8 different doses of flumethrin between 0.1 μM and 2000 μM on cell viability and cytotoxicity was investigated. The effects of 4 different doses (1, 10, 100 and 1000 μM) selected from these doses on the apoptosis/necrosis rate and the effect of the genes involved

in the apoptotic pathway on expression rates and genotoxic effects were investigated. In addition, 6 different doses of flumethrin (10- 0,0001 μM) were evaluated for the proliferative effect compared to estrogen. Expression rates of genes known to increase with estrogen (pS2, ER α , ER β and PGR) 10 μM , 1 μM and 0,1 μM selected among these doses were investigated. The obtained data showed that flumethrin had cytotoxic effects due to dose increase, increased apoptosis and genotoxic effects occurred. In addition, toxic effects of flumethrin did not occur at low doses were found to have estrogenic effects.

June 2019, 108. pages.

Keywords: Flumethrin, Pyrethroids, pesticide, apoptosis, estrogenic effect



1. GİRİŞ

Pestisitler birçok tarımsal alanda, yerleşim yerlerinde, ticari ve endüstriyel sektörde pest denilen kemirgenler, mantarlar, böcekler ve yabancı otlar gibi zararlı canlıların kontrolü ve öldürülmesi için uygulanmaktadır. Ancak, pestisitler uygulandıkları alanlarda havaya, suya ve biyokütleyle karıştığından ekosistem ve insan sağlığında risk yaratmaktadır. İnsan sağlığı açısından pestisit kalıntılarına maruziyet evrensel bir problem halini almıştır. Pestisit maruziyetleri kontamine suların ve yiyeceklerin yenilmesi; kontamine hava, toprak ya da endüstriyel buharların solunması; ve kontamine sularla (yüzme, banyo, yağmur), hava ya da toprakla dermal temas yoluyla olmaktadır (Li ve Jennings, 2017).

Pestisitlerin en önemli ve en büyük grubunu oluşturan insektisitler kimyasal gruplarındaki farklılıklara göre; organofosforlular, karbamatlar, organoklorlular ve piretroidler olarak gruplandırılmaktadırlar. Bu grupların arasından piretroidler, organoklorlular ve organofosfatlılara göre memelilerde daha düşük toksisiteye ve çevrede daha az kalıntıya neden olmaktadır (Costa, 2008; Kojima ve diğ., 2004; Mnif ve diğ., 2011). Bundan dolayı piretroidler, tarım, medikal, veterinerlik, aquatik sistem ve evde pest kontrolünü de içeren geniş çaplı insektisit uygulamalarıyla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanımları insanlarda maruziyetin artmasına neden olmaktadır (Romero ve diğ., 2017; Radovanović ve diğ., 2017). Piretroidlere uzun süreli düşük doz maruziyet sinir sistemi, immün sistem, kardiyovasküler sistemde kronik hastalıklara neden olabilir ve teratojenite, karsinojenite ve mutajeniteyi içeren toksik etkiler oluşturabilmektedir (Tang ve diğ., 2018). Ayrıca erkek ve dişi üreme sisteminde istenmeyen etkilere neden olabilmektedir (Tang ve diğ., 2018; Marettova ve diğ., 2017).

Flumetrin, sığır, kuzu, keçi, at ve köpek gibi birçok hayvanda ve arıcılıkta ektoparazitlere karşı kullanılmakta olan bir piretroid pestisittir (Mishra ve diğ., 2012a; Elias, 2013; Başçi ve Eraslan, 2015). Flumetrinin toksisitesi ile yapılan in vivo çalışmalar incelendiğinde, flumetrin maruziyetinin hepatik enzim seviyelerinin ve monooksijenaz sistem faaliyetlerinin yanı sıra antipirin metabolizmasını da azalttığı gösterilmiştir (Anadon ve diğ., 1995). Ayrıca flumetrinin, MDA (malondialdehit), ALT, AST seviyelerini arttırdığı; katalaz, SOD (süperoksit dismutaz) seviyelerini ise azalttığı bu sebeple oksidatif strese neden olduğu ve

hepatotoksik etkileri olduğu ifade edilmiştir (Mishra ve diğ., 2012a). Flumetrinin in vivo olarak genotoksik etkilerinin gösterildiğı çalışmada, farelerde dermal ve intraperitoneal flumetrin uygulanması sonrasında kemik iliğı hücrelerinde mitotik indeks, kromozom aberasyonu ve mikronükleus oluşumunda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Nakano ve diğ., 1996). Ancak in vitro olarak toksik etkilerini gösteren çalışma oldukça az sayıdadır (Yurdakok-Dikmen ve diğ., 2017; Blomberg, 2017).

Bu çalışmada, flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde pestisitler, piretroidler, flumetrin ve apoptoz konuları ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuvarında uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır. Yapılan bu işlemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışma, akarisit olarak yaygın şekilde kullanılan flumetrinin toksik etkilerinin; hücre canlılığı, sitotoksitesi apoptotik indeksi ve apoptoz yolağında görevli proteinlerin gen ekspresyonu belirlenerek, östrojenik etkilerinin; östrojene bağı hücre proliferasyonu ve östrojenik genlerin ekspresyonu belirlenerek ve genotoksik etkilerinin; mikronükleus ve Komet oluşumları belirlenerek ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PESTİSİTLER

Pestisitler, modern tarım metodlarını kolaylaştırmak ve yiyecek üretimini arttırmak için üretilmiş olan; pest de denilen zararlı canlıları önlemek, öldürmek, uzak tutmak veya azaltmak için kullanılan madde veya madde karışımlarıdır (Klaassen ve Watkins III, 2015; Mailman ve diğ., 2015). Pestisitler dünyada ve ülkemizde tarım ve hayvancılıkta olduğu kadar günlük hayatta da oldukça sık kullanılan kimyasal maddelerdir (Anand ve diğ., 2006; Vural, 2005; Delen ve diğ., 2005; Chen ve diğ., 2002).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisit tanımını; “insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması ve/veya pazarlanması sırasında bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddelerdir” şeklinde yapmıştır (FAO, 2002).

Dünyadaki pestisit tüketiminde 2014 yılı verileri incelendiğinde yıllık yaklaşık 2 milyon olduğu ve bunun %45'inin sadece Avrupa, %25'inin ise Amerika'ya ait olduğu görülmektedir (De ve diğ., 2014). Ülkemizde ise 30 bin tona yakın pestisit tüketimi olduğu belirtilmektedir (Faostat, 2016; Durmuşoğlu ve diğ., 2010).

2.1.1. Sınıflandırması

Pestisitler, etkili oldukları canlılara, kimyasal yapılarına ve toksisite derecelerine göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır.

Pestisitler, etkili oldukları canlılara göre Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) tarafından şu şekilde sınıflandırılmışlardır: “AC: akarisitler (akarlar), A: apisitler (yaprak biti), B: bakteriyostatikler (topraktaki bakteriler), FM: fumigantlar, F: fungusitler (mantarlar ve küfler), herbisitler (yabani otlar), insektisitler (böcekler), IGR: İnsekt büyüme düzenleyiciler, Ix: İksodisitler (kene kontrolü), L: larvasitler (larvalar), M:

mollusitler (salyangoz ve diğer yumuşakçalar), MT: mitisidler (kene/parazitler), N: nematositler (nematodlar), PGR: Bitki büyüme düzenleyiciler, R: repellentler (uzaklaştırıcılar), rodentisitler (kemirgenler), S: sinerjistler” (Costa, 2008; WHO 2010).

WHO, ayrıca hastanelere başvuru zehirlenme olayları ve ölümler nedeniyle, pestisitleri sıçanlardaki akut oral veya dermal toksisiteyi göz önüne alınarak, Küresel Uyum Sistemine göre (GHS- Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) sınıflandırmıştır. Bu sistem, Birleşmiş Milletler tarafından, tehlikeli kimyasalların sınıflandırılması için geliştirilmiştir, 2009 yılında düzenlenen kılavuza göre sınıflandırma tablo 2. 1’de gösterilmiştir (Hayo ve Werf 1996; WHO, 2010).

Tablo 2. 1: Pestisitlerin Küresel Uyum Sistemine (GHS) göre sınıflandırılması (WHO, 2010)

GHS kategorileri	Sınıflandırma kriterleri			
	Oral		Dermal	
	LD50 ^a (mg/kg bw)	Zararlılık İfadesi	LD50 ^b (mg/kg bw)	Zararlılık İfadesi
Kategori 1	< 5	Yutulduğunda ölümcüldür	< 50	Deri ile teması ölümcüldür
Kategori 2	5 - 50	Yutulduğunda ölümcüldür	50 - 200	Deri ile teması ölümcüldür
Kategori 3	50 - 300	Yutulduğunda toksiktir	200 - 1000	Deri ile teması toksiktir
Kategori 4	300 - 2000	Yutulduğunda zararlıdır	1000 - 2000	Deri ile teması zararlıdır
Kategori 5	2000 - 5000	Yutulduğunda zararlı olabilir	2000 - 5000	Deri ile teması zararlı olabilir

^a Oral veriler sıçan içindir ^b Dermal veriler sıçan yada tavşan içindir.

Bunların dışında pestisitler kimyasal yapılarına göre de sınıflandırılabilirler. WHO’ya göre pestisitler kimyasal yapılarına göre; Arsenik bileşikler (AS), Organofosforlu bileşikler (OP), Bipiridin türevleri (BP), Organotin bileşikler (OT), Karbamatlar (C), Fenoksiasetik asit türevleri (PAA), Kumarin türevleri (CO), Pirazoller (PZ), Bakır bileşikler (CU), Piretroidler (PY), Civa bileşikler (HG), Triazin türevleri (T), Nitrofenol türevleri (NP), Tiokarbamatlar (TC), Organoklorlu bileşikler (OC) şeklinde sınıflandırılmışlardır (WHO, 2010).

2.1.2. Tarihçesi

Pestisitlerin yıllardır insanlar tarafından kullanıldığı bilinmektedir (Sevil ve diğ., 1991). Pestisit kullanımı ile ilgili ilk kayıtların M.Ö 1500'lere ait olduğu ve bu yıllarda papirüsler üzerinde insektisit tariflerinin yer aldığı belirtilmektedir (Altıkat ve diğ., 2009). Bilinen ilk pestisit Mezopotamya'da M.Ö 1000 yılında kükürtün insektisit ve fungusit amaçlı olarak kullanımıdır (Sevil ve diğ., 1991; Altıkat ve diğ., 2009). M.Ö. 100 yıllarında Romalılar *hellebore* bitkisini sıçan, fare ve insektlerin kontrolünde kullanırken, M.S. 900 yıllarında Çinliler bahçe insektlerinin kontrolünde arsenik kullanmışlardır (Fishel, 2013). Gerçek anlamda pestisit kullanımı ise arsenik, civa, kurşun gibi toksik kimyasalların tarımda kullanılması ile 15. yy'da başlamıştır (Altıkat ve diğ., 2009). Bunun bir sonucu olarak ilk sentetik pestisit olan DDT 1940'ların başında hem vektörlerle bulaşan hastalıkları çözeceği hemde gıda üretiminin artırılmasında büyük yarar sağlayacağı düşünülmüş ve kullanılmıştır. (Hayo ve Werf 1996; Fishel, 2013). Bu tarihe kadar pest kontrolü bitkilerden ve inorganik bileşiklerden sağlanmaktayken, 2. Dünya Savaşı ile DDT isimli sentetik kimyasal askerler arasındaki insektisit kaynaklı hastalıkların çözümünde önemli rol oynamıştır (Fishel, 2013). Günümüzde halen çok sık kullanılan bir herbisit olan 2,4-D'in de içinde olduğu fenoksiasetikasit türevleri 1942'de; organofosfat grubu insektisitler ise 1946'da kullanılmaya başlanmıştır. 1950 ve 1960'lar pestisitlerin birçok grubunun araştırıldığı, geliştirildiği ve ticarileştirildiği yıllar olmuştur (Fishel, 2013). Sanayileşmenin arttığı ülkelerde, 1960'ların Yeşil Devrimi sonrasında, ekili yüzeyleri, mekanizasyonu ve hibrit mahsulleri artırarak daha yüksek verim almanın yanı sıra pest kontrolünün artması tarımsal verimliliğini önemli ölçüde arttırmıştır (Mnif ve diğ., 2011). Bu mücadele, çiftçiliğin en büyük engelleri olan kemirgenleri, mantarları, böcekleri ve yabani otları öldürmek için tasarlanmış olan bu zararlı kimyasallar yani pestisitlerin yoğun şekilde kullanılmasını gerektirmiştir (Mnif ve diğ., 2011). Pestisitlerin temel amacı insan sağlığına büyük yararlar sağlamaktır. Bunun için tarımsal pestleri (hastalıklar ve otlarda dahil olmak üzere), bitki hastalık vektörlerini, insan ve hayvan hastalık vektörlerini ve rahatsız edici organizmaları ve diğer insan aktivitelerine ve yapılarına (bahçeler, dinlenme alanları vb.) zarar veren organizmaları kontrol etmeye yardımcı olmaktadır. Dahası yiyecek üretiminde artış, güvenli yiyecek temini gibi sekonder yararlar da sağlamaktadırlar (Mnif ve diğ., 2011; Xu ve diğ., 2008).

Ancak 1962 yılında Dr. Rachel Carson tarafından pestisitlerin çevreye ve özellikle kuşlar üzerine zararlı etkilerinin olduğunu belirttiği “Silent Spring” isimli kitabı yayınlanmıştır (Mnif ve diğ., 2011). 1972’de EPA (Environmental Protection Agency)’nın DDT kullanımını yasaklaması ile birlikte birçok ülke de yasaklanmaya başlanmıştır (Fishel, 2013; Vural, 2005). Bu ülkeler arasında yer alan Güney Afrika’da 1966’da DDT yasaklandığında 10000’den sıtma olgusu bulunurken, yasak sonrasında bu sayı 62000’e yükselmiş ve DDT tekrar kullanılmaya başlanarak sıtma olgusu sayısını 12500’e düşürmüştür. Bu olay sonrasında pestisitlerin kullanımının tamamen yasaklanması değil dengeli ve kontrollü şekilde kullanılması gerektiği fikrine ulaşılmıştır. Bu durum 20. yy’da daha az etkin madde ile daha etkili ve çevreye daha az zararlı bileşiklerin kullanılması ile denge düzeyine ulaşılmıştır (Costa, 2017; Fishel, 2013).

2.1.3. Zehirlenmeler

Pestisitlerin yaygın kullanımlarına bağlı olarak intihar ya da kazara zehirlenmeler ve ölümler Dünyada ve ülkemizde görülmektedir. Yapılan çalışmalarda dünya genelinde pestisitlerle intihar sonucu yaklaşık 250 bin ölüm olduğu ve bunun intiharların %30’unu oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca pestisit zehirlenmelerinin daha çok az gelişmiş ülkelerde yoğunlaştığı belirtilmiştir (Gunnell ve diğ., 2007). Ülkemizde meydana gelen ölüm vakalarından bazıları şu şekildedir; 1979 yılında Ödemiş’te paration etken maddesi ile yanlışlıkla kızartılan börekleri yiyerek zehirlenen 16 kişi’den 6 kişi ölümü, 1973’de Kars’ta parationu saç ve elbise temizliğinde kullanan 37 kişinin ölümü, 1963’te Bursa’da 1979’da Ödemiş’te paration ile ilaçlanmış meyvelerden zehirlenme ve ölüm vakaları, ayrıca 1956’da Diyarbakır’da bir fungusit olan heksaklorobenzenle (HCB) ilaçlanmış buğdayı yiyen 3000’in üstünde kişiye "porfiria kutan tarda" tanısı ile epidemik zehirlenme görülmesi ve bu olay sonucu zehirlenmelerin %10’unun ölümle sonuçlanması örnek olarak verilebilir (Vural, 2005).

2.1.4. Toksisitesi

Pestisitler birçok tarımsal alanda, yerleşim yerlerinde, ticari ve endüstriyel sektörde pestlerin kontrolü ve öldürülmesi için uygulanmaktadır. Ancak, pestisitler uygulandıkları alanlarda havaya, suya ve biyokütleyle karıştığından ekosistem ve insan sağlığında risk yaratmaktadır. İnsan sağlığı açısından pestisit kalıntılarına maruziyet bir evrensel bir problem halini almıştır. Pestisit maruziyetleri, kontamine sular yiyeceklerin yenilmesi, kontamine hava, toprak ya da

endüstriyel buharın inhale edilmesi ve kontamine sularla (yüzme, banyo, yağmur), hava ile ya da toprakla dermal temas yoluyla olmaktadır (Li ve Jennings 2017). Bireyler tarafından alındıklarında, çeşitli metabolik ve sistemik fonksiyon bozukluklarına ve kronik hastalıklara neden olmaktadır (Soomro ve diğ., 2008).

Ancak insanlar pestisitlere yalnızca gıdalar ya da çevresel maruziyet yolları ile (su, toprak ve hava) değil mesleki olarak da maruz kalmaktadırlar (Kjeldsen ve diğ., 2013). Pestisit üretiminde çalışanlar, uygulayıcılar ve çiftçiler yüksek doz maruziyet için ana risk grubunu oluşturmaktadırlar. Sprey işçileri pestisit karışımlarına ekinler üzerine spreyleme, taşıma ve karıştırma sırasında direkt olarak ve kontamine olmuş toprak, hava, içme suyu, yiyeceklerin tüketilmesi ve sigara içerken maruz kalabilmektedirler. Genel popülasyondaki bireylerin kontamine yiyecek, içecek ya da evlerde kullanım sonucu oluşan maruziyetleri bu sektörde çalışan işçilere göre çok daha düşük seviyelerdedir (Al-Sarar ve diğ., 2015; Soomro ve diğ., 2008). Epidemiyolojik çalışmalar mesleki maruziyetler ile kanser, diyabet, nörodejeneratif ve üreme bozuklukları, doğumsal defektler, gelişimsel toksisiteler, nefropatiler, solunum, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar gibi kronik patolojiler arasında pozitif korelasyon olduğu göstermektedir (Ilboudo ve diğ., 2014).

2.1.4.1. Oksidatif strese etki

Pestisitler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu tetikleyebilirler. Bu moleküller, enzimlerde, lipidlerde, proteinlerde, karbonhidratlarda ve nükleik asitlerde hasara neden olmaktadır (Yılmaz ve diğ., 2015). Pestisit maruziyetinin farklı dokularda oksidatif stres oluşumuna neden olması toksisitesinin ana kaynağı olarak belirtilmektedir (Banerjee ve diğ., 2001).

2.1.4.2. Sitotoksik, Genotoksik ve Teratojenik etki

Pestisitlerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Ila ve diğ., 2008; Gupta ve diğ., 2013; Madhubabu ve Yenugu, 2014; Romero ve diğ., 2017, Huang ve diğ., 2016; Lu ve diğ., 2011; Sundaramoorthy ve diğ., 2016) Birçok pestisit genotoksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak kromozomal aberasyon testi (CA), sitokinez bloklu mikronükleus testi (CBMN), kardeş kromatit değişimi (SCE) ve DNA fragmentasyon testi ile gösterilmiştir (Al-Sarar ve diğ., 2015; Calderón-Segura ve diğ., 2018; Calderón-Segura ve diğ., 2012; Chaufan ve diğ., 2019; Ila ve diğ., 2008; Ismail ve Mohamed,

2012; Marinowic ve diğ., 2012; Muranli, 2013; Nagy ve diğ., 2014; Rajini ve diğ., 2015; Salvagni ve diğ., 2011).

Pestisitlere hamilelik sırasında maruz kalma ile ilgili endişeler giderek artmaktadır. Çalışmalar, piretroidlere maruz kalmanın yenidoğa sağlığı üzerine doğum yaşı, immün sistem ve nörogelişimi ile ilgili olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir (Dereumeaux ve diğ., 2018)

2.1.4.3. Endokrin bozucu etki

Pestisitler, hayvanların ve insanların endokrin sisteminde değişimlere neden olduğundan dolayı endokrin bozucu kimyasallar arasında yer almaktadırlar (Miranda-Contreras ve diğ., 2013; Mnif ve diğ., 2011).

Pestisitlerin eşey hormonlarını etkilemesi ve dolayısıyla sperm kalitesini, üreme gelişimini ve kabiliyetini ve kanserojenezi (neoplastik lezyonlar için potansiyel oluşturma) etkileme konusunda büyük endişeler bulunmaktadır. Pestisitlerin endokrin bozucu etkileri tablo 2.2’de gösterilmiştir. Eşey hormonlarında bu bozucu etkiyi östrojen ve androjen reseptörlerini bloke ederek ya da onları taklit ederek direkt etkileşim ile veya steroid hormonlarının metabolizmasında, taşınmasında veya hipotalamopitüiter-gonadal ekseninde değişimlere neden olmasıyla dolaylı olarak göstermektedir (Saillenfait ve diğ., 2016; Andrade ve diğ., 2002a).

Tablo 2. 2: Pestisitlerin erkek ve kadınlarda endokrin bozucu etkileri (Mehrpour ve diğ., 2014; Bretveld ve diğ., 2006; Ye ve diğ., 2017)

Erkeklerde;	Kadınlarda;
Hormon konsantrasyonlarında değişim	Menstrüal siklus bozuklukları
Sperm sayısı, kalitesi ve motilitesinde azalma	Hormon konsantrasyonlarında değişim
Spermde DNA hasarı	Gebelik süresinin uzaması
Anormal sperm sayısında artış	Spontan abortuslar
Spermatogenezin inhibisyonu	Ölü doğumlar
Testis ağırlığında azalma	Gecikmiş puberte başlangıcı

Pestisitlerden yaklaşık 105 tanesinin endokrin bozucu olduğu bunların arasında %46'sının insektisit, %21'inin herbisit ve %31'inin fungusit olduğu belirlenmiştir (Mnif ve diğ., 2011). Pestisit kalıntılarının yalnızca çevrede değil birçok gıda içerisinde bulunması ve her yerde minimal önlemlerle kullanılıyor olmaları sebebiyle pestisitlerin endokrin bozucu etkileri sağlık açısından risk oluşturmaktadır (Kjeldsen ve diğ., 2013). Yapılan çalışmalar pestisitlerin östrojenik etkilerini *in vivo* olarak ve *in vitro* olarak göstermiştir (Kjeldsen ve diğ., 2013). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, birçok pestisit hem östrojen agonisti hemde androjen antagonisti olduğu, bazılarının hem östrojen hem androjen antagonisti olduğu gösterilmiştir (Andersen ve diğ., 2002; Go ve diğ., 1999; Chen ve diğ., 2002; Jin ve diğ., 2010; Laffin ve diğ., 2010).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, tarımda çalışan kişilerde pestisitlere maruziyetin semen kalitesinin değiştirdiğini bu sebeple fertilitiyi ve üremeyi direkt ve indirekt olarak etkilediği göstermektedir (Miranda-Contreras ve diğ., 2013).

2.1.4.4. Kalıntı sorunu

Pestisitlerin yoğun ve yanlış kullanımları sonucu hava, su, toprak ve yiyeceklerde kirliliğe neden olmaktadır (Al-Sarar ve diğ., 2015). Pestisitlerin çevreye karışması sonucu, hava, toprak ve yeraltı sularını da kapsayan bir döngüye girmesine neden olmaktadır (Xu ve diğ., 2008). Bu sebeple dünyadaki yetkililer, yerleşim bölgelerinde toprak ve havadaki, içme sularındaki, yeraltı sularındaki ve yiyeceklerdeki pestisit kalıntılarının standart değerlerinin belirlenmesi için yıllardır çalışmaktadırlar. Pestisitlerin toprak için belirlenen maksimum miktarları dünya çapında uygulanmakta olup, bu değerler belirlenirken pestisitlerin yüzey suları ya da yeraltı sularına taşınması sonucu oluşacak riskler göz önünde bulundurulmamıştır. Benzer şekilde içme suları için maksimum konsantrasyon değerleri (Maximum concentration levels- MCL) bulunmakta ancak geniş çaplı pestisit kullanımlarına karşı insan sağlığını koruma niteliğinde olmamaktadır. Birçok pestisit tarımda ürünlere, sebze ve meyvelere direkt uygulandıklarından dolayı yenidoğanlar, çocuklar ve yetişkinler en fazla pestisitlerle kontamine yiyecekler sonucu maruz kalmaktadırlar. Bazı tarımsal ürünlerde bulunabilecek maksimum pestisit konsantrasyonunu belirten pestisit maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limits-MRL), iyi tarım uygulamalarını (Good Agricultural Practice-GAP) desteklemek için birçok ülke tarafından düzenlenmiştir. Fakat yiyecek tüketimi mevsime, jeolojiye, kültüre, kişisel alışkanlığa, ekonomik duruma ve mahsulün

mevcudiyetine bağılı olarak değiştiğinden, bunların hepsinin pestisit maruziyeti üzerinde etkisi olduğu için ve insan sağlığını korumak için sayısız tarımsal ürününe karşı pestisit MRL'leri geliştirmek çok önemlidir. Birçok pestisit için belirlenecek MRL miktarları insan sağlığını korumak için ancak oldukça yüksek olarak verildiğinde sağlanmaktadır (Li ve Jennings 2017).

Yapılan çalışmalarda, insanlardan alınan serum, yağ doku, anne sütü ve idrar örneklerinde tespit edilen pestisit miktarları giderek artmaktadır. Bu durum vücudumuzdaki pestisit kalıntılarının biyoakümülyasyondan dolayı arttığı endişelerini oluşturmaktadır (Banerjee ve diğ., 2001).

2.2. PİRETROİDLER

Doğal piretrinler, altı aktif madde içeren “pire otu” olarak bilinen *Chrysanthemum cinerariaefolium* türü çiçeklerden elde edilmektedirler (Yang ve diğ., 2018; Anadon, ve diğ., 2009; Arslan ve Yılmaz, 1993). Doğal piretrinler, evlerde ve çiftliklerdeki insektlerin kontrolünde güçlü insektisidal özellik göstermektedir. Doğal piretrinlerde bulunan aktif maddeler piretrin I ve II, sinerin I ve II ve jasmolin I ve II olup bu maddeler birçok farklı türde insekte karşı güçlü etkinlik gösterse de, kalıcılıkları oldukça düşük olup, hava ve güneş ışığı ile teması sonrası kolayca bozunmaktadır (Yang ve diğ., 2018; Anadon ve diğ., 2009). Bundan dolayı stabilitesi arttırılmış ve sikloprospan karboksilik ester temel yapısı korunmuş, ilk sentetik piretroid olan alletrin 1949 yılında sentezlenmiş olup, onu takiben ilk önce permetrin ve bundan kısa süre sonra sipmetrin ve deltametrin sentezlenmiştir (Anadon ve diğ., 2009; Davies ve diğ., 2007). Deltametrin keşfedildiği dönemde o zamana kadar bilinen en aktif insektisitti. Sumitomo Chemical Company tarafından geliştirilen ilk sikloprospan olmayan piretroidler (örneğin fenvalerate) de bu dönemde sentezlenmiştir. 1975'ten 1983'e kadar kene ve akarlar karşı etkinliği arttırılmış, fluvalinate ve flumethrin bileşikleri geliştirilmiştir (Davies ve diğ., 2007).

Doğal piretrinlerle karşılaştırıldığında sentetik piretroidler daha iyi kalıcılık sağlamaktadır ki bu da, onların daha uzun süreli etkili olmasını sağlamaktadır (Yang ve diğ., 2018; İla ve diğ., 2008). Bu sebeple, 1970'lerin başında tarımsal aktiviteler için kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra evlerde ve bahçecilikte insektisit olarak; sivrisinek kontrolü ile vektör taşınmasının önlenmesinde, evcil hayvanlarda ve hayvancılıkta ektoparaziter hastalıklarda ve

tıbbi olarak olmak üzere yaygın şekilde kullanılmaya başlanmışlardır (İla ve diğ., 2008; Wolansky ve diğ., 2006; Andrade ve diğ., 2002a). Son verilere göre piretroid insektisitler, dünya insektisit pazarının %30'dan fazlasını oluşturmaktadır (Calderón-Segura ve diğ., 2018).

Diğer pestisitlerden farklı olarak piretroidler; yüksek hidrofobik oluşu, zengin stereokimyasallığı ile geniş spektrumlu yüksek insektisidal aktivite göstermektedirler (Braganca ve diğ., 2018). Bir piretroid bileşiğin konformasyonu; onun biyolojik aktivitesi ve fizyokimyasal özelliklerinin temel belirleyicilerindendir (Calderon-Segura ve diğ., 2018). Piretroidler kompleks konfigürasyona ve 1-3 arası kiral merkez içermelerinden dolayı 2-8 stereoizomere sahiptirler (Lu ve diğ., 2011).

2.2.1.Sınıflandırması

Sentetik piretroidler piretrinlerden doğal olarak oluşan toksinlerin daha kararlı özellikteki sentetik esterleridir (Liu ve diğ., 2011). Piretroidler, yüksek dozda oluşan etkilerine ve kimyasal yapısındaki değişimlerine göre Tip I ya da Tip II olarak sınıflandırılmaktadırlar. Tip I piretroidler primer ya da sekonder alkol esterleridir, tip II piretroidler ise alkol biriminin fenoksi benzil grubunda α karbonunda bir siyano grubu bulunduran sekonder alkol esterleridir. Tip I piretroidler hipereksitasyon, ataksi, olası paralizlerle agresyon, hipersensivite, genel tremor, seyirme şeklinde konvülziyonlar, koma ve ölüme neden olan T (Tip I) sendromuna, tip II piretroidler tükürük salgısının artmasıyla ortaya çıkan hipersensivite, koreoatetoz, kaba tremor, kas tonusunun artışı, kıvrınma şeklinde konvülziyonlar ve ölüme neden olan CS (Tip II) sendromuna neden olmaktadır. Sıçanlardaki akut toksisitesinde görülen farklılıklar açısından da, tip II piretroidler genellikle daha etkili kimyasallardır (Romero ve diğ., 2015; Anand ve diğ., 2006; Suman ve diğ., 2006; Wolansky ve diğ., 2006).

2.2.2.Etki mekanizması

Piretroidlerin temel etki mekanizmaları insektlerin nöronal aksiyon potansiyeli üretiminde yer alan hücre membranında sodyum geçirgenliğini düzenleyen voltaja bağlı sodyum kanalları inhibe etmektir. Ayrıca, sodyum potasyum ATPaz kanallarını inhibe eder ve sodyum gradiyentini bozarak diğer nörotransmitterlerin salınımını stimüle eden gerilimi bloke eder (Soderlund ve diğ., 2002; Gupta ve diğ., 2013; Patel ve diğ., 2007). Sodyum kanallarındaki bu değişimin sonucu olarak, sodyum kanallarının ne kadar süre açık kalmış olma durumuna göre

ya tekrarlayan ateşlenme ya da nöronal depolarizasyonunun blokesi olur (Calderón-Segura ve diğ., 2018). Genel olarak etki mekanizması açısından karşılaştırıldığında; tip II piretroidler sodyum kanallarının inaktivasyonunda tip I piretroidlere göre daha uzun süreli (> 10 ms) gecikme sağlarlar. Tip I piretroidler, DDT'ye benzer şekilde aksiyon potansiyelinin tekrar tekrar ateşlenmeye (tekrarlayan deşarj) neden olacak kadar uzun süre kanalın açık kalmasını sağlar. Tip II bileşikler ise, depolarizasyon oluşana kanalları açık tutar ve aksiyon potansiyelinin mümkün olmaması sağlanır (depolarizasyon-bağımlı blok) (Klaassen ve Watkins III, 2015). Ayrıca tip 1 piretroidler daha çok periferik nöronlar üzerine etkiliyken, tip 2 piretroidler santral sinir sisteminde etkilidir. Bu nedenle, tip 2 piretroidler tip 1 den daha toksiklerdir (Miao ve diğ., 2017).

Piretroidlerin etki noktası voltaja bağlı sodyum kanallarıdır ancak klor, kalsiyum ve diğer kanallar da hedef noktası olabilirler (Romero ve diğ., 2015). Nöronal dokulardaki diğer kanallar ve reseptör sistemleri (kalsiyum kanalları ve GABA_A reseptörleri) memelilerde bileşiğe spesifik klinik semptomların ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak piretroidlerin bu diğer kanallarda ya da reseptörlerde etkisi tam olarak kesinleşmemiştir (Wolansky ve diğ., 2006).

2.2.3.Toksisitesi

Piretroidler memeli türlerinde hidrolizle toksik olmayan metabolitlerine kolayca dönüştüklerinden dolayı güvenilir kabul edilirler ve insektisitlerin hidrolitik aktiviteleri yavaş olduğundan pestisitlerin selektif olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çevrede diğer insektisitlere göre düşük kalıcılığı nedeni ile yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Ancak sentetik piretroidler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından orta derecede tehlikeli (sınıf II) olarak belirlenmişlerdir ve insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturmaktadır (WHO, 2010). WHO'ya göre intihar dahil şiddetli akut zehirlenmeler tahmini olarak 3 milyon vaka, intoksikasyona bağlı oluşan ölüm raporları 2.2 milyondur. Piretroid maruziyeti ile ilgili vaka sayıları, organofosfat, organoklor ve karbamatların yerine geçtiklerinden dolayı giderek artmaktadır (Nakamura ve diğ., 2007; Calderón-Segura ve diğ., 2018).

Sentetik piretroidlerin serbest kullanımları, uzun süreli maruziyet çalışmalarında hedef-dışı birçok organizma için intoksikasyon riskinde artışa neden olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, piretroidlerin de memeli ve diğer canlı gruplarında çeşitli toksik etkileri olduğunu

göstermiştir. Sentetik piretroidlerin, memeli ve memeli olmayan türlerde nörotoksik, karsinojenik, genotoksik, immunotoksik, reproduktif, apoptotik ve endokrin etkileri olduğunu ayrıca oksidatif stresi arttırdığını gösterilmiştir (Lu ve diğ., 2011, Calderón-Segura ve diğ., 2018).

Birçok piretroidin apoptozu indüklediği (Deltametrin (El-Gohary ve diğ., 1999, Gupta ve diğ., 2013); cypermetrin (Huang ve diğ., 2016); alletrin (Madhubabu ve Yenugu 2014)), oksidatif hasara neden olduğu (cypermetrin (Taju ve diğ., 2014; Huang ve diğ., 2016); cyhalotrin (Deeba ve diğ., 2016); alletrin (Madhubabu ve Yenugu 2014)) ve genotoksik etkiler gösterdiği (bifentrin (Rajini ve diğ., 2015); cypermetrin (Taju ve diğ., 2014; Suman ve diğ., 2006); cyflutrin (Marinowic ve diğ., 2012, Ila ve diğ., 2008); permetrin (Sundaramoorthy ve diğ., 2016); deltametrin (Ismail ve Mohamed, 2012); fenotrin (Nagy ve diğ., 2014)) belirtilmiştir.

Ayrıca yapılan çalışmalar uzun süreli piretroid pestisit maruziyetinin Parkinson, Alzheimer demansı ve Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğunu göstermektedir. Uzun süreli maruziyetler sonrasında nörokognitif performansta bozulmalar olduğu da belirtilmektedir (Hansen ve diğ., 2017). Piretroidlerin gelişim nörotoksitesine sahip olduğu da belirlenmiştir ve neonatal sıçanların yetişkinlerden daha hassas olduğu görülmüştür (Nakamura ve diğ., 2007).

Piretroidlerin immün sistem üzerine toksik etkileri olduğu gösterilmiştir. Piretroidlere maruziyetin periferik kan lökositlerinin proliferasyonunu inhibisyonuna ve IgG immünoglobulinlerinin konsantrasyonunu azalmasına neden olabilmekte, bundan dolayı makrofajların azalmasına, interlökin-2 (IL-2), interlökin-8 (IL-8), interlökin 12p70 (IL12p70) ve interferon γ (IFN- γ) azalmasına yol açabilmektedir. Bu kimyasallardan bazıları karaciğer ağırlığının azalmasına, kemik iliği hücrelerinin artışına ve timüste apoptozun artışına neden olmaktadır. Ayrıca, piretroidler allerji ve astıma neden olmaktadır (Skolarczyk ve diğ., 2017).

Piretroidlerin oksidatif stresi indüklediği birçok çalışma ile karaciğer, beyin, böbrek ve eritrosit gibi çeşitli hücre ve organlarda bu durum gösterilmiştir. (Abdollahi ve diğ., 2004, Sadowska-Woda ve diğ., 2010). Piretroidler, hücre membran bütünlüğünü bozan ve hücre ölümüne neden olan çeşitli olayları başlatan serbest radikalleri oluşturabilmekte ve oksidatif

strese yol açmaktadır (Madhubabu ve Yenugu, 2014). Bazı piretroidler için oksidatif strese olan etkilerinin enantiomer spesifik olarak gerçekleşmektedir (Lu ve diğ., 2011).

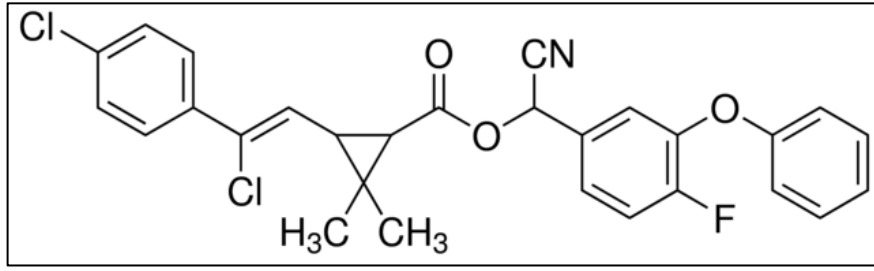
Sentetik piretroidler 1997 yılında U.S EPA tarafından olası endokrin bozucu kimyasallar arasında yer almışlardır. (Andrade ve diğ., 2002b). Yapılan birçok çalışma ile piretroid pestisitlerin tiroid hormonlarını bozucu etkiler, östrojenik, antiöstrojenik, antiandrojenik ya da antiprogostatik etkileri araştırılmıştır (Chen ve diğ., 2002; Go ve diğ., 1999; Saito ve diğ., 2000). *In vivo* yapılan çalışmalarda; Fenvaleratın triiyodotironin (T3) ve tiroksin (T4) seviyelerini arttırdığı ve λ -cyhalotrin ve bifentrinin T3,T4 seviyelerinin azalttığı gösterilmiştir (Kaul ve diğ., 1996; Akhtar ve diğ., 1996). Deltametrinin sperm parametrelerinde bozulmaya neden olduğu, serum testosteron, FSH ve LH seviyelerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Sharma ve diğ., 2014; Issam ve diğ., 2009). *In vitro* yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; piretroidlerden bir kısmının östrojen reseptörüne bağlanabilme yeteneğinden (Go ve diğ.,1999; Chen ve diğ., 2002; Zhao ve diğ., 2008), çok az kısmının düşük antiöstrojenik aktivitesinden (Kojima ve diğ., 2004), bazılarının antiandrojenik etkisinden söz edilmektedir (Xu ve diğ., 2008; Saito ve diğ., 2000). Bazı piretroidlerin ise östrojenik/antiöstrojenik ya da antiandrojenik aktivitesinin olduğu gösterilmemiştir (Du ve diğ., 2010).

Son birkaç yıldır, piretroidler organofosfatlar ve karmabatlar gibi çevreye daha zararlı olan pestisitler yerine geçerek, farklı veteriner uygulamaları da dahil olmak üzere tarımda en çok kullanılan pestisitler olmuşlardır. Ancak yapılan çalışmalarda, piretroid ve metabolitlerinin kalıntıları; meyve, sebze, çay, pastörize süt, et gibi yiyeceklerin yanı sıra toprak ve su gibi çevresel kompartımanlarda da tespit edilmiştir (Miao ve diğ., 2017; Lei ve diğ., 2017; Marettova ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2011). Araştırmalar piretroidlerin birçok tipinin evdeki çevresel ortamlarda (toz, yer bezleri gibi), yiyecek ve içeceklerden insanlara maruziyet oluşabileceğini göstermektedir. Araştırmalar göstermiştir ki, insanların pestisitlere maruziyetinin temel yolu oral alım (yiyeceklerle) ve yiyecek dışı (toz) ile olmaktadır (Romero ve diğ., 2015). Piretroidlerin yoğun şekilde ve sık kullanımları çevresel zararlarını arttırmakta ve balık ve omurgasız hayvanlar üzerine yüksek toksik etkileri nedeniyle aquatik ekosistem üzerinde de potansiyel etkileri bulunmaktadır (Braganca ve diğ., 2018).

2.3.FLUMETRİN

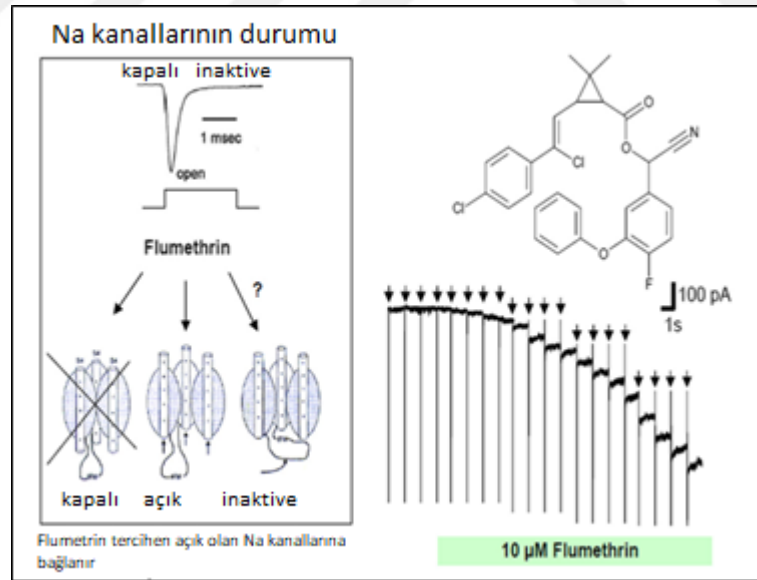
Flumetrin piretroid grubu pestisitlerden biri olup, 1986 yılında Bayer tarafından akarisit olarak sentezlenmiştir (De Paoli ve Barbina, 1992). Kimyasal ismi (RS)-a-siyano-4-fluro-3-fenoksibenzil- 3-(b,4-diklorostyryl)-2,2 dimetilsiklopropankarboksilat ($C_{28}H_{22}Cl_2FNO_3$) olan flumetrin, 510,4 moleküler ağırlığa sahip sarımtırak renkli vizköz yağ formundadır (Kaneko, 2001). Kimyasal olarak izomerlerin kompleks bir karışımıdır. Flumetrin molekülü asimetrik olarak yerleşmiş üç karbon atomuna sahiptir ve siklopropan halkası etrafında cis / trans geometrisine ayrıca etilenik çift bağ etrafında Z ve E geometrisine sahiptir. Sonuç olarak toplam 16 izomerik konfigürasyonda bulunmaktadır. Trans Z2 izomeri trans Z1 izomerinden akut olarak daha toksiktir. Flumetrinin kimyasal yapısı şekil 2.1’de verilmiştir. Bayer tarafından 2 farklı formülasyon olarak pazara sunulmuştur, biri %92 trans-Z izomeri ve %8 cis-Z izomeri olarak dökme preparat ve diğeri ise daldırma/sprey formda emülsiyon haline getirilebilir preparatlardır (Schnitzerling ve diğ., 1989).

Flumetrin yağda çözünebilir bir insektisittir, sığır, kuzu, keçi at ve köpeklerde ektoparazitlerin kontrolünde kullanılmaktadır. Veterinerlikte, topikal olarak %1 w/v üstüne dökülerek, %6 w/v daldırma çıkarma ile ya da pellet olarak tasmlarla tek başına ya da diğer piretroidlerle birlikte kullanılabilir (Mishra ve diğ., 2012b; Stanneck ve diğ., 2012b; Basci ve Eraslan, 2015). Ayrıca arıcılıkta *varroa* akarlarına karşı akarisit olarak, flumetrin emdirilmiş stripler aracılığı ile kovan içlerine yerleştirilerek kullanılmaktadır (Tan ve diğ., 2013; De Paoli ve Barbina, 1992). Tip II piretroid sınıfına dahil olan flumetrin, 1-siyano grubu içerdiğinden koreoatetoz ve salivasyonla karakterize sendroma (CS sendromu) neden olmaktadır. Molekülün asidik kısmı halo-vinil parçaya sahip siklopropankarboksilik asitten türevlenirken 1-siyano-4fluro-3-fenoksibenzil parçaya sahip alkolik kısım ve klorofenil kısmı içermektedir (Bissacot ve Vassilieff, 1997).



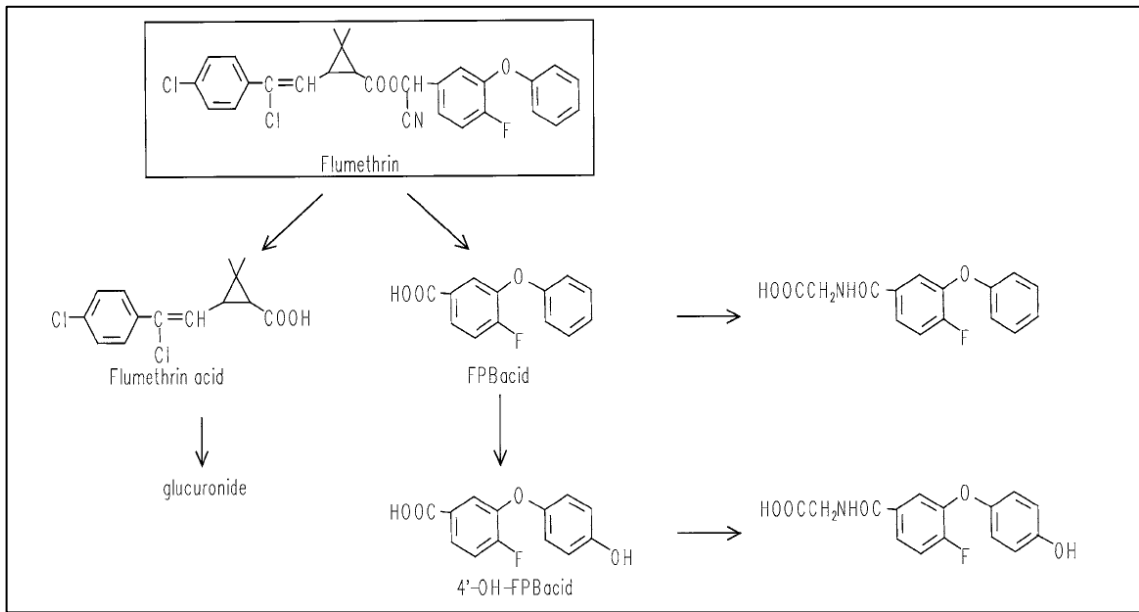
Şekil 2. 1: Flumetrinin kimyasal yapısı (Bissacot ve Vassilieff, 1997)

Flumetrinin temel etki mekanizması insektlerin nöromembranlarının aksonlarında bulunan voltaja bağlı sodyum kanalları üzerine göstermektedir. Özellikle açık olan voltaja bağlı sodyum kanallarının inaktivasyonu ile iyon geçirgenliğinin uzun süre devam etmesini sağlayarak kalıcı depolarizasyon yaratmaktadır (şekil 2.2). Böylece Na^+ akışının devam etmesi sonucu duyu nöronlarının organ ve kaslar üzerinde uzun süreli tekrarlayan uyarımlarıyla insektlerde öldürücü etki oluşturmaktadır. Ayrıca Cl kanalları üzerine etkileri olduğu da düşünülmektedir (Mishra ve diğ., 2012b; Stanneck ve diğ., 2012b).



Şekil 2. 2: Flumetrinin etki mekanizması (Stanneck ve diğ., 2012a)

Flumetrin; bağırsaklar, akciğerler ve çok hızlı bir şekilde deriden absorbe olmaktadır ve *in vivo* esteraazlar ve monooksijenazlar tarafından metabolize edilmektedir. Flumetrin vücutta, permetrin ve deltametrinin aksine glukuronidasyon gerektirmeyen basit bir metabolizmaya uğrar. Flumetrinin metabolizması şekil 2.3’de gösterilmiştir. Metabolizasyonu sonrasında temel metaboliti olan ve konjugasyonsuz şekilde feçesle atılan flumetrin asit oluşmaktadır. Flumetrin asit farmakolojik olarak inaktif bir metabolittir (Stanneck ve diğ., 2012b; Anadon ve diğ., 1995; Kaneko ve Miyamoto, 2001).



Şekil 2. 3: Flumetrinin metabolizması (Kaneko ve Miyamoto, 2001)

2.3.1.Toksisitesi

Flumetrinin çeşitli deney hayvanlarında toksik etkileri olduğu bulunmuştur. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, flumetrine oral ya da intraperitoneal olarak uygulandığında karaciğer enzimlerinde anlamlı değişimlere neden olduğu, oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre flumetrinin hepatotoksik olabileceği belirtilmiştir (Mishra ve diğ., 2012b; Anadon ve diğ., 1995). Flumetrinin *in vivo* olarak genotoksik etkilerinin gösterildiği çalışmada, farelerde flumetrin uygulanması sonrasında kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks, kromozom aberasyonu ve mikronükleus oluşumu incelenmiştir. Flumetrinin sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği, bu durumun da klastojenik ve anojenik etkilerinden dolayı görülebileceği belirtilmiştir (Nakano ve diğ., 1996).

In vitro yapılan çalışmalar incelendiğinde, Yurdakök ve diğ. 2017’de yaptıkları çalışmada, teke ve köpek spermaları üzerine flumetrinin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Sperm kalitesi parametrelerinde anlamlı değişiklikler olmamasına rağmen, MTT yöntemi ile belirlenen IC50 değerleri sırasıyla 67,89 ve 114,47 µg/ml olarak bulunmuştur (Yurdakök-Dikmen ve diğ., 2017).

Carlsson ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada, zebra balığı embriyolarında flumetrinin, fertilizasyondan 48 saat sonrasında mortaliteye neden olmadığı ancak kalp ritminde artış ve kuluçka süresinde azalma görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca flumetrinin NOEC (Olumsuz etki tespit edilmeyen konsantrasyon -No Observed Effect Concentrations) sınırları içerisinde en çok toksik etki görülen kimyasallar arasında olduğu belirtilmiştir (Carlsson ve diğ., 2018).

Flumetrin arıcılıkla sıklıkla kullanıldığından dolayı, uygulanması boyunca bal arılarının direkt ya da indirekt olarak maruz kaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, uygulama sonrasında da kovanlar yeniden yapılanması sırasında, arılar peteklerde kalan flumetrine düşük dozda maruz kalabilmektedirler. Yapılan çalışmada, flumetrinin balarılarının yaşamı üzerine olumsuz etkileri olduğu, ayrıca arıların koku alımını da etkiledikleri gösterilmiştir (Tan ve diğ., 2013).

Flumetrin kalıntılarının çevrede ve gıdalarda bulunmasıyla ilgili yapılan araştırıldığında, flumetrinin de içinde bulunduğu dört piretroidin günlük süt veren ineklerin sütünde ve kanında HPLC yöntemi ile araştırılmış ve hiçbir piretroid kalıntısı tespit edilememiştir (Bissacot ve Vassilieff 1997). Tayland’da yapılan çalışmada, 200 meyve suyunda piretroidlerin analizi yapılmış örneklerin %23.5’inde flumetrin varlığı tespit edilmiştir ve bulunan miktarlar MRL (Maximum Kalıntı Limiti) sınırları içerisinde yer aldığı belirtilmiştir (Poapolathep ve diğ., 2017). Ayrıca, biyoakümüülasyonun incelendiği bir diğer çalışmada denizkestanelerinin yumurta ve gonadlarında flumetrin kalıntısı bulunmuştur (Rocha ve diğ., 2018).

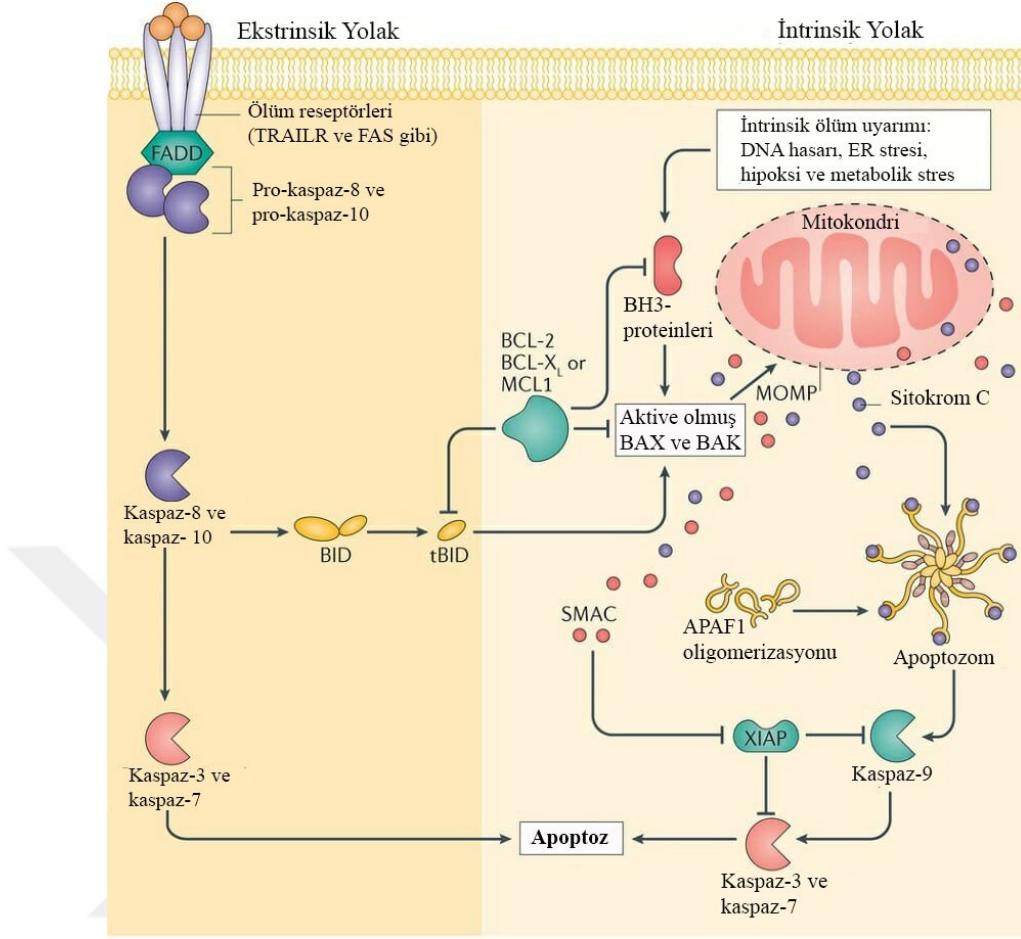
İspanya’da balmumu üzerine yapılan çalışmada, 35 örnekte QuEChERS yöntemi ile flumetrinin de içinde bulunduğu 58 pestisit kalıntısı incelenmiş ve flumetrinin bulunma sıklığı %54 olarak bulunmuştur. Ortalama bulunan değer; 87.2 ng/g; maksimum değer: 120,1 ng/g; minimum değer: 24.5 ng/g. olarak belirtilmiştir (Calatayud-Vernich ve diğ., 2017). İtalya’da 2013-2015 yılları arasında toplanan 178 balmumunda 247 pestisit kalıntısı araştırılmış ve

flumetrin bulunma sıklığı %4.5 olarak ve ortalama bulunan değer: 0,04 mg/kg; maksimum değer: 0,11 mg/kg; minimum değer: 0,01 mg/kg olarak bulunmuştur (Perugini ve diğ., 2018). Çin’de 2014 yılında araştırılan 135 bal örneğinde, yedi farklı lokasyondan alınan balların %75.3’ünde flumetrin kalıntısı bulunmuş, bölgelere göre veriler arasında en düşük ortalama değer 0.0586 mg/kg, en yüksek ortalama değer 0.126 mg/kg olarak bulunmuştur (Yu ve diğ., 2015).

2.4. APOPTOZ

Apoptosis terimi (a-po-toe-sis) ilk kez 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü biçimini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr ve diğ., 1972). Apoptoz çeşitli dokularda görülen gelişim ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarının korunması için normal fizyolojik bir olan programlı hücre ölümüdür. Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda ya da hastalık veya toksik ajanlar tarafından hasarlanan hücrelerde de bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler benzer uyaranlara karşı apoptoz yanıtı oluşturmazlar. Apoptoz geçiren hücrelerde karakteristik olarak biyokimyasal ve morfolojik değişimler görülmektedir (Elmore, 2007; Wang ve Phang, 1995).

Memeli hücrelerinde apoptozun gerçekleşmesi için mitokondri bağımlı intrinsik yolak ve ölüm reseptörlerinin aktifleştirdiği ekstrinsik yolak olmak üzere temel iki yol bulunur. Apoptoz yolakları şekil 2.4’de verilmiştir. Ayrıca T hücre aracılı sitotoksikite sonucu oluşan ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yolakta mevcuttur. Tüm yolaklarda apoptoz hücre ölümü ile ilişkili olan kaspaz proteinlerinin kontrolü altında gerçekleşir ki bunlar aspartat kalıntılarından ayrılan anahtar hücresel proteinler olan sistein proteazlardır. Kaspazlar hücrede yer alan inaktif proenzimlerdir ve çoklu mekanizmalarla aktive edilmektedir. Kaspazların iki türü bulunur, başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8 ve 9 gibi) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7 gibi). Başlangıç kaspazları eksternal sinyallerle (prokaspaz-2, -8 ve -10) ya da mitokondriden kaynaklanan (sitokrom c) internal sinyallerle (prokaspaz-9) aktive edilmektedir (Pilane ve diğ., 2015; Sharifi ve diğ., 2015; Almeida ve diğ., 2005).



Şekil 2. 4: Apoptoz mekanizmasının ekstrinsik ve intrinsik yolları (Ichim ve Tait, 2016)

İntrinsik mekanizma ısı şoku, UV radyasyonu ve DNA hasarı ile tetiklenebilir. Bu yolda, bcl-2 ailesi proteinleri apoptozun moleküler mekanizmasında anahtar rol oynayarak düzenleyici role sahiptirler. Bu proteinler hücre membranında yapışık ya da sitozolde serbest haldedir. Mitokondrinin intraselüler membranını kullanarak intrinsik apoptoz yolağını düzenler (Pilane ve diğ., 2015; Sharifi ve diğ., 2015). Bu ailenin proapoptotik üyeleri Bax, Bid ve Bad, antiapoptotik üyeleri ise Bcl-2 ve Bcl-XL'dir (Pilane ve diğ., 2015). Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri bcl-2 ve bcl-xL mitokondriyal bütünlüğü koruyarak sitokrom C salınımını baskırlar. Bu durumun tersi olarak proapoptotik üyeler olan Bax, Bid ve Bad mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasının bir sonucu olarak sitokrom C salınımını indüklemektedirler. Apoptotik uyarı oluştuğunda, Bcl-2 ailesi proteinleri yer değişimleri gösterirler. Bax normalde sitozolde yer almaktadır, apoptotik uyarım sonrası sitozolden mitokondri membranına gider ve apoptotik sinyali başlatır. Bax'ın translokasyonunu takiben sitokrom C salınımı gerçekleşir ve sonrasında kaspaz aktivasyonu oluşur (Pilane ve diğ.,

2015, Sharifi ve diğ., 2015). Pro-apoptotik olan bcl-2 proteininin aşırı üretimi ise, apoptozu bloke etmekte ve eksternal ölüm sinyallerine karşı sağkalımı arttırmaktadır. Bcl-2'nin antiapoptotik aktivitesini bax proteini modüle etmektedir. Apoptozun olup olmayacağı, bcl-2:bax proteini oranı ile dengelenmektedir (Wang ve Phang 1995; Kim ve diğ., 2008).

Her iki mekanizmada da p53 (proapoptotik) tümör baskılayıcı bir gendir ve nükleer stres sinyalini iletme yeteneğine sahiptir ve Bcl-2 (antiapoptotik) ile Bax (proapoptotik) tarafından modüle edilir. Hücre siklusunun kontrolü, proliferasyonu ve apoptozda görevlidir. Temel rolü, hücre büyümesinin çeşitli aşamalarını ve apoptozu düzenleyecek genomun bütünlüğünün sürdürülmesini sağlamaktır. p53 hücre siklusundaki hasarlı hücreleri G1 fazında durdurabilir böylece DNA'nın onarımı için süre sağlanacak ya da yaygın bir hasar söz konusu ise apoptoz indüklenecektir (Pilane ve diğ., 2015; Almeida ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2008).

Hücredeki apoptoz yolağında önemli rola sahip bir diğer protein hücre siklusunu negatif olarak düzenlediği bilinen p21 proteinidir. Siklin bağımlı protein kinaz inhibitörü olan p21 proteini p53 tarafından indüklenabilen bir gen ürünüdür. p53'ün arttığı durumlarda, p21 proteini birikmekte sonuçta hücre siklusu G0/G1 fazında durdurulmaktadır ve DNA hasarının onarılamadığı durumlarda hücreyi apoptozla götürmektedir (Zhang ve diğ., 2014; Huang ve diğ., 2016).

Apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri ışık ve elektron mikroskopları ile tanımlanmıştır. Apoptozun erken döneminde hücre büzülmesi ve piknozu görülmektedir. Hücre büzülmesinde, hücreler küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller daha sıkı paketlenir. Hücre piknozu, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve apoptozun en karakteristik özelliğidir. Histolojik incelemede apoptoz, tek hücreyi veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazmaya ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanlarına sahip yuvarlak veya oval bir kütle olarak görünür. Yoğun plazma zarı kabarcıklar oluşturur, bunu takiben karyoreksiz ve "tomurcuklanma" olarak isimlendirilen hücre fragmanlarının apoptotik cisimlere dönüşmesi olayı gerçekleşir. Apoptotik cisimler, nükleer fragmana sahip olan ya da olmayan sıkı paketlenmiş organelleri olan sitoplazmaları içermektedir. Organel bütünlüğü korunmaya devam eder ve tamamı bozulmamış bir plazma zarı içine alınır. Bu apoptotik cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagositozlanır ve fagolizozomlar içinde parçalanır (Elmore, 2007; Baskic ve diğ., 2006).

Apoptotik hücre ölümünün alternatifi, toksik bir süreç olarak kabul edilen hücrenin pasif olduğu ve enerjiden bağımsız bir ölüm şekli olan nekrozdur. Apoptoz ve nekrozu histolojik olarak ayırt etmek kolay değildir, uyarıcının yoğunluğu ve süresi, ATP tükenmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağlı olarak aynı anda oluşabilirler. Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir olayken, apoptoz kontrollü ve enerjiye bağlıdır, bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir. Nekrotik hücre hasarı ile ilişkili iki temel mekanizma vardır, hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarına doğrudan hasar oluşumu. (Elmore, 2007; Baskic ve diğ., 2006).

Nekrozla birlikte meydana gelen başlıca morfolojik değişikliklerin bazıları hücre şişmesi; sitoplazmik vakuollerin oluşumu; şişmiş endoplazmik retikulum; sitoplazmik kabarcıkların oluşumu; yoğunlaşmış, şişmiş veya yırtılmış mitokondri; ribozomların ayrıştırılması ve ayrılması; parçalanmış organel membranları; lizozomların şişip ve yırtılması ve sonrasında hücre zarının bozulması şeklindedir. Bu hücre zarı bütünlüğünün kaybı, sitoplazmik içeriğin çevre dokuya salınması ile sonuçlanır ve kemotaktik sinyaller gönderilmesi ile enflamatuvar hücrelerin göçü sağlanır (Elmore, 2007).

Apoptotik hücreler, hücresel bileşenlerini çevresindeki interstisyel dokuya salmadıkları ve makrofajlar veya bitişik normal hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagositoz oldukları için, enflamatuvar reaksiyon oluşmaz. Ayrıca, piknoz ve karyoreksiz'in apoptoza özel olmadığı ve nekroz ile ortaya çıkan sitomorfolojik değişikliklerin bir parçası olabileceği de önemli bir noktadır (Elmore, 2007).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, flumetrinin farklı dozları MCF-7 hücrelerine farklı sürelerde uygulanmıştır. Deney süreleri sonunda spektrofotometrik yöntem kullanılarak hücre canlılığı ve östrojenik etki, mikroskobik sayım yöntemiyle genotoksik ve apoptotik etki ve RT-PCR yöntemi ile apoptoz yolağı ile ilişkili genler (bcl-2, bax, p53 ve p21) ve östrojen ile stimüle edilen genlerin (ps2 ,ER α , ER β ve PR) ifade düzeyi ölçülerek flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

3.1.KULLANILAN HÜCRE SOYU VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Deneylerde kullandığımız MCF-7 hücre soyu insan meme adenokarsinom hücreleridir. Laboratuvarımıza İstanbul Üniversitesi Kök hücre Araştırma Laboratuvarı'nın ATCC'den temin ettiği ve çoğaltarak -80 °C'de stokladığı kanser hücre soyu panelinden temin edildi. MCF-7 hücre soyu *in vitro* koşullarda iki-üç günde düzenli pasajları yapılarak yetiştirildi. Hücreler ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal sıgır serumu, 2mM L-glutamin ve PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş DMEM -yüksek glikoz kültür medyumunda % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren nemli ortamda, 37⁰C'de inkübe edilerek çoğaltıldı.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

Flasktaki hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Flasktaki DMEM-yüksek glikoz kültür medyumunu uzaklaştırıldı ve Tripsin/EDTA (% 0.05) ile 37⁰C'de 5 dakika muamele edilerek hücre tabakasının flask zemininden ayrılması sağlandı. Pipetaj yapılarak toplanan hücreler santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant atıldı. Dipte bulunan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumunu ilave edilerek, her deney için gerekli sayıda hücre kültür kaplarına ekildi. Deneyler için kullanılmayacak hücreler FBS ve % 5 DMSO (Dimetilsülfoksit) içeren dondurma medyumunu içerisinde 24 saat -80⁰C'de sonrasında uzun süreli depolama için -196⁰C'lik sıvı azot tankı içerisinde dondurularak saklandı.

3.3. FLUMETRİN VE ÖSTROJEN KONSANTRASYONLARININ AYARLANMASI

Çalışmada kullanılacak flumetrin konsantrasyonu 40mM ve 400mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesi için kullanılacak olan flumetrin stok çözeltiden %10 FBS içeren DMEM (yüksek glikoz) ile DMSO konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde hazırlanmıştır. Sitotoksik etkinin gösterilmesi için 1, 10, 100, 200, 500, 1000, 2000 μ M dozları belirlenmiştir.

Östrojenik etkinin belirlenmesi için kullanılacak flumetrin ve östrojen konsantrasyonları medyum ve serumdaki östrojenik etkiyi minimize etmek için %10 charcoal ile muamele edilmiş FBS ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM (yüksek glikoz) ile hazırlanmıştır. Charcoal ile muamele sonrasında serum içerisindeki tüm steroid hormonlardan arındırma sağlanmış olacaktır. Fenol kırmızısı ise, medyum içeriğine pH değişikliklerinin göstergesi olarak eklenmekte, ancak yapılan çalışmalarca düşük östrojenik etkisi olduğu gösterilmektedir (Welshons ve diğ., 1988). Hücrelere uygulanacak flumetrin %0,01 DMSO içeren, östrojen ise % 0,01 etanol içeren deney medyumunu ile uygun dozlarda hazırlanmıştır. Flumetrin konsantrasyonları östrojenik etkinin gösterilmesi için 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M ve 0,0001 μ M olacak şekilde ayarlanmıştır. Östrojen dozları ise MCF-7 hücreleri üzerinde çoğalma etkisinin en belirgin olduğu dozlar 10^{-8} M, 10^{-9} M ve 10^{-10} M olacak şekilde belirlenmiştir (Go ve diğ., 1999).

3.4. SİTOTOKSİSİTE

3.4.1. MTT Hücre Canlılık Testi

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmış ve pipetaj yapılarak alınan hücreler MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 15 saat flaska yapışmaları beklendikten sonra hazırlanan dozlarda flumetrin içeren deney medyumunu eklenmiştir. Deney süresinin tamamlanmasıyla, her bir kuyucuğa 10 μ l MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C’de CO₂ ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda formazan kristallerinin çözünmesi için çözündürme solüsyonu eklenerek bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün mikropilaka okuyucu ile 570 nm dalga

boyunda absorbans ölçülüp OD (optik density) değerleri elde edilmiştir. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir (Mossman, 1983). Hücre canlılığının %50 düşüren değer (IC50), Graphpad Prism 6.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Yöntemi

Tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan LDH enzimi, hücre zarı parçalandığında hücre kültürü supernatantına salınmaktadır (Romero ve diğ., 2017). Bu sebeple hasarlanmış hücrelerin daha fazla olduğu deney gruplarında LDH enzim aktivitesi artmaktadır. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşümle NAD⁺, NADH/H⁺'ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör madde NADH/H⁺ dan H/H⁺ bir tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümünü gerçekleştirir. Hücre zarında oluşan hasar arttıkça LDH enzim aktivitesi de artış göstermektedir. Deneyi gerçekleştirmek için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışmaları için 24 saat 37°C CO₂ inkübatöründe bekletildikten sonra, hazırlanmış olan flumetrim konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda yeni kültür kabına aktarılan hücre medyumlarının üzerine kit içerisinde bulunan boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan karışım her kuyuya 100 µl olmak üzere eklenmiştir. 30 dk karanlıkta inkübe edilen kültür kabı 492nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda okunarak absorbans değerlerine göre hesaplama yapılmıştır. Toksisite yüzdesini hesaplamak için kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}}{\text{Pozitif kontrol LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5. APOPTOTİK ETKİ

3.5.1 Akridin Turuncusu/ Etidyum Bromür (AO/EtBr) Yöntemi

Akridin Turuncusu ve Etidyum Bromür floresan boyası, apoptoz sırasında hücre membranındaki apoptozla ilişkili değişiklikleri belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ayrıca apoptozun farklı evrelerinde hücrelerin ayırt edilmesini sağlamaktadır (Liu ve diğ., 2015). Akridin turuncusu hem canlı hemde ölü hücreleri boyamakta ve DNA çift sarmalının arasına girerek yeşil floresan ışıma verirken, RNA tek sarmalına bağlanarak kırmızı ışıma vermektedir. Etidyum bromür ise yalnızca ölü hücrelerde DNA sarmalının arasında girerek kırmızı ışıma vermektedir (Baskic ve diğ., 2006). Erken evredeki apoptotik hücreler hilal şeklinde ya da granüler sarı-yeşil renkli olarak akridin turuncusu ile boyanmış şekilde görünmektedir. Geç evredeki apoptotik hücreler, yoğunlaşmış ve asimetric olarak lokalize olmuş turuncu olarak etidyum bromürle boyanmış olarak belirlenmektedir. Nekrotik hücreler ise hücre hacmindeki artış ve periferinde düzensiz turuncu-kırmızı boyanmış olarak görülmekte, parçalanmaya başlanmış durumda bulunmaktadır (Liu ve diğ., 2015).

Akridin turuncusu/ Etidyum bromür yöntemi Pajaniradje ve diğ. (2014)'e göre yapılmıştır. MCF-7 hücreleri 24 kuyulu kültür kaplarına 2×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapıldıktan ve hücrelerin tutunması sağlandıktan sonra flumetrinin dört farklı dozu (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) 24 saat süre ile uygulanmıştır. Deney süresi sonrasında tripsinle kaldırılan hücreler PBS ile resüspense edilmiş ve hücre süspansiyonuna PBS içerisinde hazırlanmış olan 60 μ g/ml akridin turuncusu ve 100 μ g/ml etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir. 37 $^{\circ}$ C'de 5 dk inkübe edilen hücreler Zeiss 200 (Carl Zeiss, Germany) marka floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki apoptoz/nekroz oranını belirlemek için her örnekten 600 hücre sayılmıştır (Pajaniradje ve diğ., 2014).

3.6. ÖSTROJENİK ETKİ

3.6.1 E-Screen yöntemi

E-screen deneyi Körner ve diğ., (1999)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemin esası; hücre çoğalması östrojene bağımlı olan MCF-7 hücre soyunda, uzun süreli maruziyet sonrasında oluşan etkinin östrojenle karşılaştırılmasına dayanır. Bu amaçla farklı dozlarda flumetrin ve β -östrodiol 144 saat süre ile MCF-7 hücre soyuna uygulanmıştır. Çalışmada kullanılacak flumetrin ve östrojen konsantrasyonları medyum ve serumdaki östrojenik etkiyi minimize etmek için %10 charcoal ile muamele edilmiş FBS ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM (yüksek glikoz) ile hazırlanmıştır. Charcoal ile muamele sonrasında serum içerisindeki tüm steroid hormonlardan arındırma sağlanmış olacaktır. Fenol kırmızısı ise, medyum içeriğine pH değişikliklerinin göstergesi olarak eklenmekte, ancak yapılan çalışmalarca düşük östrojenik etkisi olduğu gösterilmektedir. Bu amaçla çalışmaya başlamadan 2 gün önce MCF-7 hücreleri östrojene oldukça hassas olduklarından dolayı medyum %10 charcoal ile muamele edilmiş FBS ve fenol kırmızısı içermeyen DMEM (yüksek glikoz) olan deney medyumunu ile değiştirilmiştir. (Jin ve diğ., 2010). Flask yüzeyinde %70 yoğunluğa ulaşmış hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask yüzeyinden kaldırılmıştır. 24 kuyulu kültür kaplarına 10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat yüzeye tutunmaları için 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 6 farklı doz flumetrin ve 3 farklı doz β -östrodiol içeren deney medyumları ile muamele edilerek 5 gün (uzatılmış maruziyet) boyunca 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. 5 gün sonunda hücre yoğunluğu hücresel proteinlerin ölçümünü sağlayan sulfordamin B (SRB) testi ile belirlenmiştir. SRB testi, 1990 yılında geliştirilmesinden bu yana, hücre bazlı çalışmalarda sitotoksiteyi araştırmak için çeşitli tarama deneylerini ucuz bir şekilde yapmak için kullanılmaktadır (Vichai ve Kirtikara, 2006). Bu yöntem, hafif asidik koşullar altında proteinlere bağlanan SRB boyasının ve bazik koşullarda çözünmesi ile hücre kütlelerinin ölçülmesi esasına dayanır (Orellana ve Kasinski 2016) . Buna göre, deney süresi sonunda TCA ile fikse edilen hücreler %1 asetik asitle hazırlanan SRB boyası ile boyanmıştır ve proteinlere bağlanan boyanın ölçülmesi için 10mM Tris tamponu (pH:10) eklenmiştir. Boya çözünmesinin tamamlanmasından sonra 96 kuyulu kültür kabına aktarılan çözelti 570nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda ölçülmüştür. Östrojenik etkinin gösterilmesi için proliferatif etki (PE) deney ve östrojen uygulanan gruptaki hücre canlılığının, negatif kontrol hücre canlılığına oranı ile hesaplanmıştır.

Östrojenik aktivitenin değerlendirilebilmesi için göreceli proliferatif etki; en yüksek proliferatif etkinin 100 katının deney proliferatif etkisine olan oranı ile hesaplanmaktadır. Göreceli proliferatif etkinin (RPE) hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Soto ve diğ., 1998). RPE, proliferatif etkinin büyüklüğünü kantitatif olarak östrojen ile karşılaştırmayı sağlar. RPE sonuçları; %80-100 ise tam agonist, %25-80 ise parsiyel agonist, %10-25 ise zayıf agonist ve <%10 ise negatif olarak yorumlanır.

$$\text{Göreceli proliferatif etki (RPE)} = \frac{\text{Deney proliferatif etki} - 1}{\text{E2 proliferatif etki} - 1} \times 100 \quad (3.2)$$

3.7. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ

3.7.1.Total RNA Analizi

Bu çalışmada hücrelerin total RNA izolasyonlarının yapılması için flumetrin maruziyetinde iki farkı ekim yöntemi kullanılmıştır. Flask içerisinde %70 yoğunluğa ulaşan hücrelerin 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Sitotoksik etki gösterdiği belirlenen 1, 10, 100 ve 1000 μM flumetrin ile 24 saat maruziyet yapılan hücrelerin total RNA izolasyonu Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, USA) kit kullanılarak kit içeriğine uygun şekilde yapılmıştır. Flumetrinin östrojenik etki gösterdiği dozlar için yapılacak total RNA izolasyonundan önce flask içerisindeki hücreler östrojenik etkiyi minimize etmek için %10 charcoal ile muamele edilmiş FBS ve fenol kırmızısı içermeyen medyum ile 48 saat muamele edilmişlerdir (Go ve diğ., 1999). Sonrasında 6 kuyulu kültür kaplarına her kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde ekimi yapılan hücreler, östrojenik etkili olan (10, 1 ve 0,1 μM) M flumetrin ve 10^{-9} M β -östrodiol ile 48 saat boyunca 37°C CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Deney süresinin sonunda hücrelerin total RNA izolasyonları Quick-RNA MiniPrep kit içeriğine uygun şekilde yapılmıştır. Buna göre tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılan hücreler 1500g'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra hücrelerin içeriğindeki RNA'ların açığa çıkmasını sağlayan RNA lysis buffer ile 5dk oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Toplama tüpüne yerleştirilmiş Spin-Away™ Filter kolon içerisine alınan hücreler 12000g'de 2dk santrifüj yapılarak hücre içeriğindeki DNA uzaklaştırılmıştır. Toplama tüpünde elde edilen sıvıda bulunan RNA'nın çökmesi için aynı

oranda %95 etanol ile karıştırılmıştır. İyice karıştırılarak elde edilen sıvı RNA saflaştırılması için toplama tüpüne yerleştirilen Zymo-Spin™ IIICG kolon içerisine alınmıştır. Bu kolon içerisinde RNA prep buffer ve RNA wash buffer ile yıkamalar yapılmıştır. Yıkama aşamalarından sonra kolon filtresi üzerinde kalan RNA'lar, DNase RNase-free su ile bağlanarak elde edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen RNA'ların miktar (ng/μl) ve kaliteleri (260/230) spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiskan GO) μDrop Plate kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.2. cDNA dönüşümü

Flumetrine maruz bırakılan hücrelerden elde edilen RNA'lar high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) ile cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA'ya dönüştürme işlemi Moloney murin lösemi virüsü (rmo MuLV) olan optimize edilmiş MultiScribe™ Ters Transkriptaz ile yapılmıştır. Reverse transkripsiyon reaksiyonlarının RNase-free ortamda gerçekleşmesi gerektiği için çalışma alanı DEPC'li (diethylpirokarbonat) su ile silinip cDNA'ya çevirme işlemine başlamadan önce elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları DNase RNase-free su ile eşitlenmiştir. Buz üzerinde hızlı şekilde hazırlanan reaksiyon karışımına her örnek için uygun hacimde RNA eklendikten sonra sırasıyla 2 μl 10X RT Tamponu, 0,8 μl 25X dNTP Mix (100mM), 2 μl 10X RT Random primer, 1 μl MultiScribe Ters Transkriptaz ve toplam hacim 10 μl olacak şekilde DNase RNase-free su eklenmiştir. Karışım kısa bir süre santrifüj yapıldıktan sonra Prima-Trio thermal cycler (HiMedia, India), içerisinde 10dk 25⁰C, 120dk 37⁰C ve 5 dk 85⁰C bekletilerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Yeni sentezlenmiş cDNA'lar -20⁰C'de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen cDNA örneklerinin içerdiği nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve saflık derecelerinin (A260/280) ölçümü için spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) ve μDrop Plate kullanılmıştır.

3.7.3. Primerlerin Seçilmesi

Ekspresyon çalışmalarında kullanılan genlerin primer çiftleri tablo 3.6.1.1 belirtilen kaynaklar baz alınarak SENTROMER firmasına sentezlettirilmiştir.

Tablo 3. 1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri

GEN ADI	PRİMER DİZİSİ	Kaynak
ps2	F: GCGAAGCTTGCCACCATGGAGAACAAGG R: GCGGATCCACGAACGGTGTCGTCGAA	Zhao ve diğ. 2008
ERα	F: CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTC R: ATGCGGAACCGAGATGATGATGTAGC	Zhao ve diğ. 2008
ERβ	F: TCACATCTGTATGCGGAACC R: CGTAACACTTCCGAAGTCGG	Zhao ve diğ. 2008
PGR	F: GAGCTCATCAAGGCAATT R: CCATCCCTGCCAATATCT	Zhao ve diğ. 2008
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	Zhao ve diğ. 2008
bax	F: AGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAG R: ATCTTCTTCCAGATGGTGAGCGAG	Kim ve diğ. 2008
bcl-2	F: GTGAACTGGGGGAGGATTGT R: GGAGAAATCAAACAGAGGCC	Kim ve diğ. 2008
p53	F: CGGGATCCATGGAGGAGCCGAGTCAGAT R: CCGCTCGAGTTCTGGGAAGGGACAGAAGA	Kim ve diğ. 2008
p21	F: GCGACTGTGATGCGCTAATGG R: TCCCAACTCATCCCGGCCTC	Kim ve diğ. 2008
GAPDH	F: CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT R: AGCCTTCTCCATGGTTGGTGAAGAC	Kim ve diğ. 2008

3.7.4. RT-PCR ile mRNA ekspresyonun ölçümü

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, PCR işlemi sırasında herbir döngüde başlangıçtaki şablon miktarı ile orantılı olarak üretilen DNA ürünlerinin güvenilir şekilde saptanmasını ve hesaplanmasını sağlamaktadır (Arya ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında seçilen östrojenik ve apoptoz yolağında görev alan genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi için LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kiti kullanılmıştır. PCR ürünlerinin oluşması SYBR Green 1 floresan sinyalinin ölçülmesiyle saptanır. SYBR Green 1 DNA çift sarmalına eklenir. Solüsyondaki DNA'ya bağlanmamış SYBR Green 1 boyası çok az floresan gösterirken DNA bağlanmasına bağlı olarak floresan miktarı oldukça artar. Bu nedenle PCR sırasında, SYBR Green 1 floresanının artması doğrudan çift iplikli DNA oluşumu ile orantılıdır

Real time PCR (RT-PCR) ile genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kiti kullanılmıştır. Real time PCR yönteminde DNA kalıbı olarak flumetrim uygulanmış hücrelerden elde edilen cDNA örneklerinden 100 ng olacak şekilde kullanılmıştır. Öncelikle kullanılacak olan primerler, final konsantrasyonu 0,5 μ M olacak şekilde sulandırılmıştır. Her bir kuyu için kit içeriğinde bulunan master karışımdan 10 μ l, PCR grade sudan 3 μ l ve primerlerden 1 μ l olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur. Nazikçe karıştırıldıktan sonra hazırlanan master mix üzerine 5 μ l cDNA örneği eklenmiştir. MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate içerisinde hazırlanan örnekler QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied biosystems) cihazına yerleştirilmiştir. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR cihazı dört farklı program içerir: FastStart DNA polimerazın aktivasyonu ve DNA'nın denatürasyonunun gerçekleşmesi için ön-inkübasyon, hedef DNA'nın çoğaltılması (amplifikasyon), PCR ürünlerinin tanımlanması ve rotor ile termal kısmın soğuması (inkübasyon). RT-PCR cihazı, uygulanacak olan reaksiyon koşullarına göre programlandıktan ve çalışılan reaksiyon son hacmi 20 μ L olarak programa eklendikten sonra reaksiyon başlatılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2: Real Time PCR cihazı deney koşulları

Program	Döngü sayısı	Hedef sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon	1	95 ⁰ C	10dk
Çoğalma	45	Denatürasyon 95 ⁰ C	10 sn
		Bağlanma 60 ⁰ C	30 sn
		Uzama 72 ⁰ C	25 sn
İnkübasyon	1	40 ⁰ C	30 sn

3.7.5. $\Delta\Delta CT$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi

RT-PCR sonucunda elde edilen CT değerleri bağıl kantitatif yöntem olarak bilinen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak değerlendirilmiştir (Arya ve diğ., 2005). $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodunda hedef genin CT değeri referans gene göre normalize edilir, bu işlem hem deney grubunun hedef geni için hemde kontrol grubunun hedef geni için yapılır.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{hedef, test}) - CT(\text{referans, test}) \quad (3.3)$$

$$\Delta CT(\text{kontrol}) = CT(\text{hedef, kontrol}) - CT(\text{referans, kontrol}) \quad (3.4)$$

Daha sonra deney grubunun hedef geni için hesaplanmış olan ΔCT değeri kontrol grubunun ΔCT değerine göre normalize edilir:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{kontrol}) \quad (3.5)$$

2 üzerine – değeri hesaplanarak ekspresyon oranı belirlenir:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Normalize edilmiş ekspresyon oranı} \quad (3.6)$$

Sonuçta, deney grubunun hedef genine ait normalize edilmiş değerinin kontrol grubuna göre kaç kat değişime uğradığı belirlenmiş olmaktadır (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.8. GENOTOKSİSİTE

3.8.1. Mikronükleus yöntemi

Mikronükleus yöntemi Schmid tarafından 1975 yılında fare kemik iliği hücrelerinde geliştirilmiş ve kimyasalların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Mikronükleuslar asentik kromozom fragmentleri ya da tüm kromozomu içeren ana nükleusdan kopmuş parçalardan oluşmuştur. Genotoksite sonucu oluşan kromozom kırıkları ya da kayıpları, micronükleus (MN), nüklear bud (NB) ve nükleoplazmik köprüler (NK) gibi hücresel abnormaliteleri indüklenmektedir. Mikronükleuslar hem kromozom kırıkları (klastojenik etki) hemde tüm bir kromozom kaybının sebebi olan sentromer kinetokor kompleksi ya da iğ ipliği aygıtının disfonksiyonun (anojenik etki) bir sonucu olarak oluşabilmektedir. Sitokinez bloklu mikronükleus testi kültür hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik/sitostatik etkinin ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir (Campana ve diğ., 2003; Chaufan ve diğ., 2019). Mikronükleus yöntemi, pestisit kaynaklı hasarın değerlendirildiği çalışmalarda histopatoloji ve genetik hasarı birlikte değerlendirmek için yaygın şekilde kullanılan bir yöntemdir (Vardavas ve diğ., 2016; Fenech, 1993).

Mikronükleus yöntemi Yared ve diğ., (2002) ve Slowinski ve diğ., (2004)' e göre yapılmıştır. Mikronükleus yöntemi için; hücreler 20mm lamel içeren 30mm'lik petri kaplarına 2ml ($\sim 1 \times 10^4$ hücre) olacak şekilde ekilmiştir. Lamellere tutunması sağlanan hücreler 1, 10, 100 ve 1000 μ M flumetrimle, 24 saat süre ile muamele edilmiştir. Deney süresinin sonunda medyum 2 μ g/ml sitokalazin B içeren yeni medyumla değiştirilmiştir. Sitoklazin B, mitoz sonrasında hücre bölünmesini inhibe etmek için kullanılmaktadır. Sonuçta hücrede kromozom kırığı ya da sentomer hasarı varsa, iki nükleuslu ve bir mikronükleuslu hücreler oluşmaktadır (Slowinski ve diğ., 2011). Sitokalazin B ile 24 saat inkübasyon sonrasında hücreler %96'lık soğuk etanol ile -20 $^{\circ}$ C'de ve sonrasında 3:1 oranında hazırlanmış metanol:asetik asit çözeltisi ile fiks edilip Giemsa boyası ile boyanmıştır. Boyama sonrası distile su ile yıkanan ve havada kurutulan lameller entellan ile lamlara yapıştırılmıştır. Örnekler ışık mikroskobunda 200x ve 400x objektiflerinde incelenerek hücre sayımı yapılmıştır. Kontrol ve deney gruplarındaki mikronükleus oluşumunu ölçmek ve nüklear abnormaliteleri belirlemek için her örnekten 1000 binükleat hücre sayılmıştır. Nüklear Bölünme İndeksini (NDI) hesaplamak için her örnekten rastgele 500 hücre sayılmıştır. Nüklear Bölünme İndeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Fenech, 2000).

$$NDI = M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)/N \quad (3.7)$$

3.8.2. Komet yöntemi

Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) ya da Komet yöntemi olarak bilinen yöntem, hücrelerdeki DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan çok yönlü, hassas, basit ve ekonomik bir tekniktir. Komet yöntemi ile, hücredeki DNA'daki tek/çift zincir kırıkları, alkali değişken bölgeler (apurinik/apirimidinik), DNA çapraz bağlanmaları, baz/baz çifti hasarları ve apoptotik nükleuslar görülebilmektedir. 1984 yılında Ostling ve Johnson tarafından nötral koşullarda elektrik akımına maruz bırakıldığında nükleustaki DNA kırıklarının göç ettiği gösterilmiştir. Daha sonra 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından yöntem modifiye edilmiş ve alkali koşullarda gerçekleştirilmiş, böylece spesifikliği ve tekrarlanabilirliği arttırılmıştır. Nötral komet yönteminde yalnızca tek zincir kırıkları belirlenebiliyorken, alkali komet yöntemi ile DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarının her ikisi de tespit edilebilmektedir (Nandhakumar ve diğ., 2011; Singh ve diğ., 1988; Tice ve diğ., 2000).

Komet testi Singh ve diğ., ve Tice ve diğ., 'na göre yapılmıştır. Flumetrinin 4 farklı dozu ile 24 saat muamele edilen hücreler, deney süresinin sonunda PBS ile resüspense edilerek %0,5 lik PBS içinde hazırlanmış düşük sıcaklıkta eriyen agaroz (LMA) ile karıştırılmıştır. Hücreler bir gün önceden % 1,5 lik normal sıcaklıkta eriyen agaroz (NMA) ile kaplanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuş lamaların üzerine damlatılmış ve lamel ile kaplanarak buzdolabında donması sağlanmıştır. Ardından lamalar soğuk lizis tamponu (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100) ile 1 gece muamele edilmiştir. DNA zincirlerinin çözülmesi için elektroforez tankı içinde alkali ortamda (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13.0) 20 dk bekletildikten sonra elektroforez 300mA/20V güç olacak şekilde 20 dk çalıştırılmıştır. Preparatlar, elektroforezi takiben oluşan alkali ortamı nötürlemek için 15 dk 0.4M Tris tamponunda tutulmuştur. Nötralizasyon sonrası lamalar 20 µg/ml etidyum bromür ile boyanarak her slayttan 50 komet olacak şekilde toplam 300 hücrenin floresan mikroskobu ile sayımı yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak 5µM H₂O₂ içeren medyum kullanılmıştır. Hücrelerdeki DNA hasarı TriTek CometScore™ 2.0, 2012 programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.9. İSTATİSTİK ANALİZ

Deney gruplarında uygulanan doza bağılı olarak sitotoksosite, E-screen ve genotoksosite verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.0001$, $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

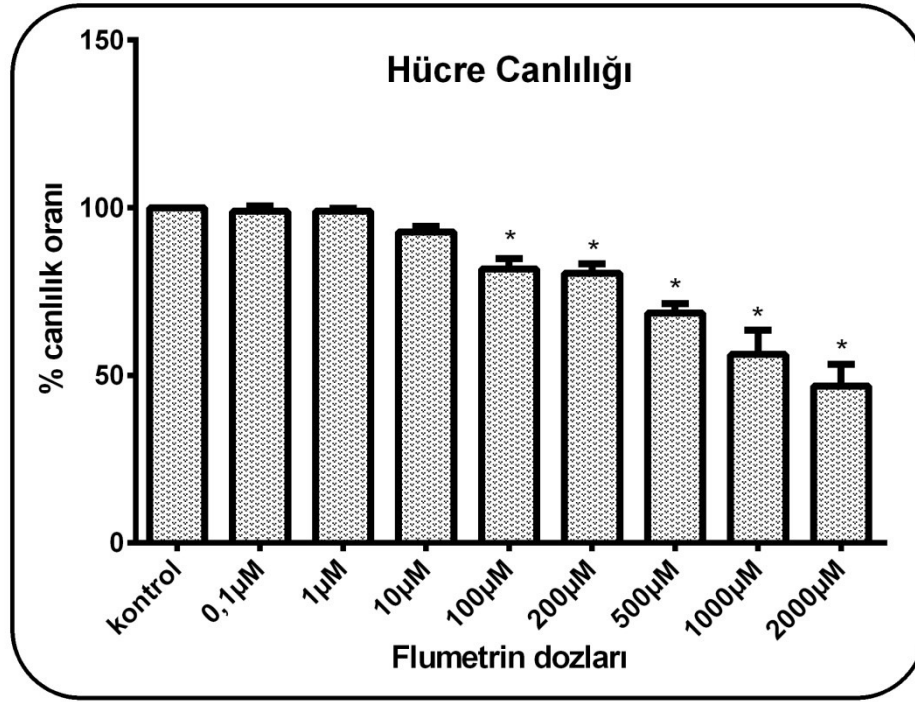
Apoptoz yolağını düzenleyen ve östrojenik genlerin mRNA düzeylerindeki, uygulanan flumetrin dozuna bağımlı değişimlerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Livak ve Schmittgen 2001'e ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's test sonuçları referans gen olan GAPDH ve kontrol koşullarına göre anlamlılık ($p<0.0001$, $p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$) dereceleri ile değerlendirilmiştir

4. BULGULAR

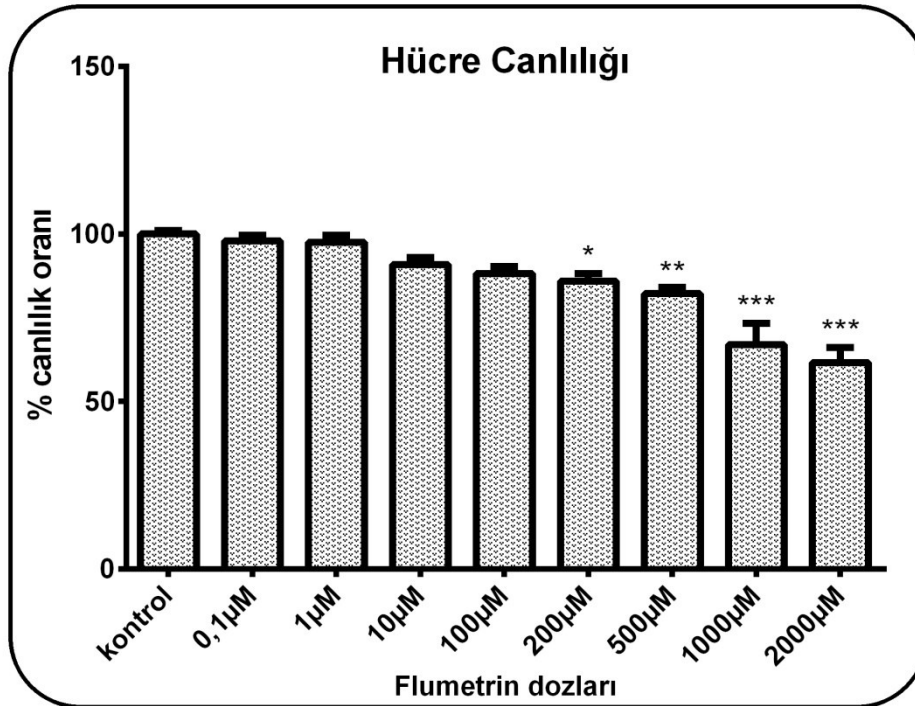
4.1.SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

4.1.1. MTT canlılık testi bulguları

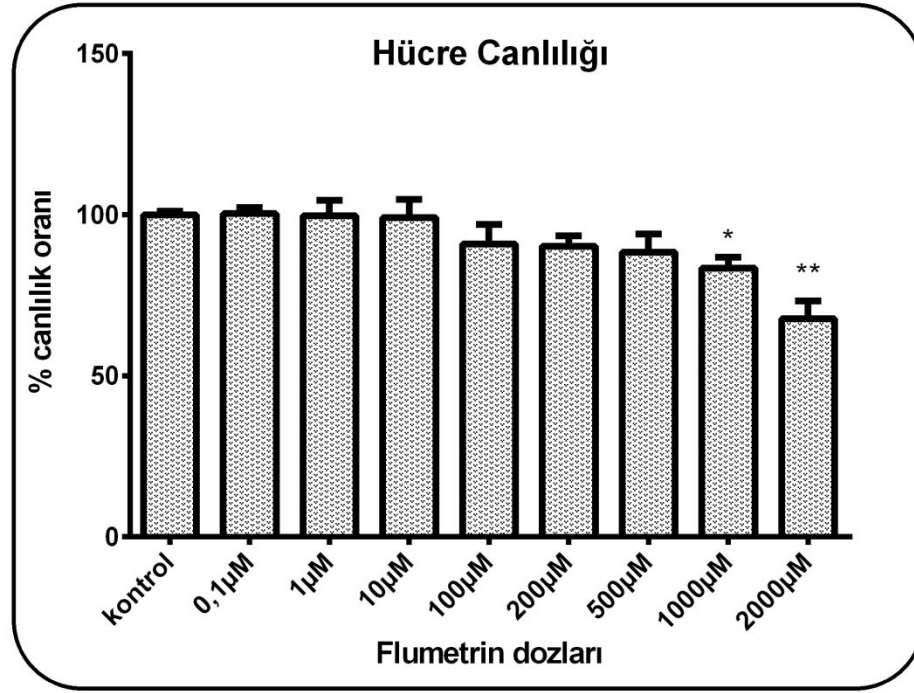
Flumetrinin sekiz farklı dozu MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanarak hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki % canlılık oranları şekil 4.1-4.3’de verilmiştir. 24 saat sonunda hücre canlılığında kontrol grubuna göre 100 μ M ve üzerindeki dozlarda doza bağlı olarak anlamlı azalma gözlenmiştir. 24 saat flumetrin uygulanması sonucu canlılık oranlarına göre %50 azalmaya neden olacak doz olan IC50 oranı 1671 μ M olarak hesaplanmıştır. 48 saat deney süresinin sonunda hücre canlılığında flumetrinin 200 μ M dozu ve üzerinde anlamlı azalma olduğu, 72 saat süre ile flumetrinin maruziyetinin ise 1000 μ M dozu üzerinde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. 48 ve 72 saat için IC50 dozu sırasıyla, 5453 μ M ve 7411 μ M olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 1: Flumetrinin 24 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,0001).



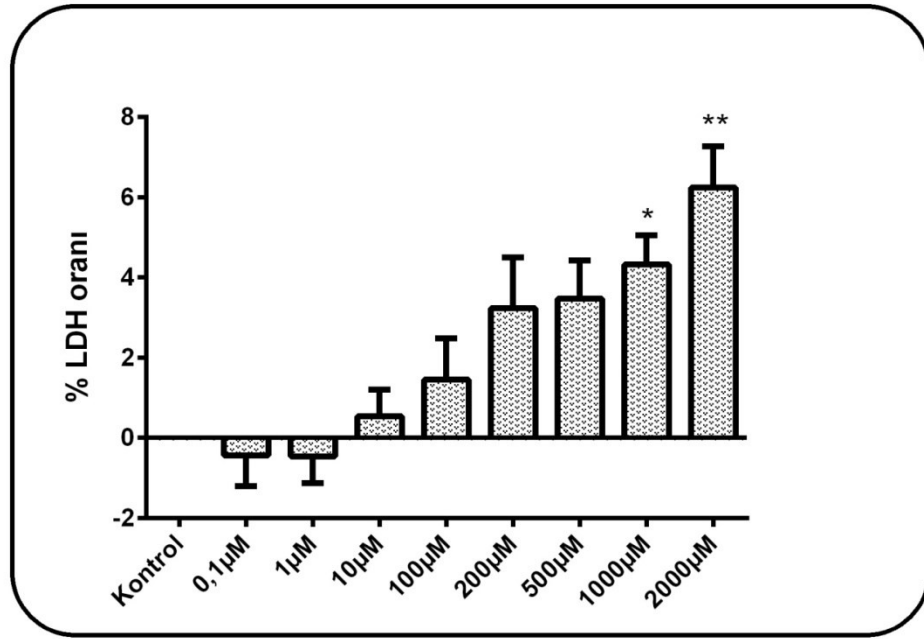
Şekil 4. 2: Flumetrinin 48 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,0001).



Şekil 4. 3: Flumetrinin 72 saat maruziyeti sonrası hücre canlılığı üzerine etkileri (*:p<0,05; **:p<0,0001).

4.1.2. Laktat Dehidrogenaz bulguları

Flumetrin uygulanan MCF-7 hücrelerinin ve kontrol grubunun spektrofotometrik yöntem kullanılarak NAPH^+ 'daki azalma hızı oranına bağlı olarak hesaplanan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı şekil 4.4'de verilmiştir. 24 saat deney süresinin sonunda kontrol grubu ve flumetrinin 8 farklı dozu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 1000 μM ve 2000 μM flumetrin uygulanan gruplarda anlamlı bir artış saptanmıştır (sırasıyla; $p<0,01$ ve $p<0,0001$).



Şekil 4. 4: Flumetrinin MCF-7 hücrelerinde laktat dehidrogenaz aktivitesine etkileri (*: $p<0,01$; **: $p<0,0001$).

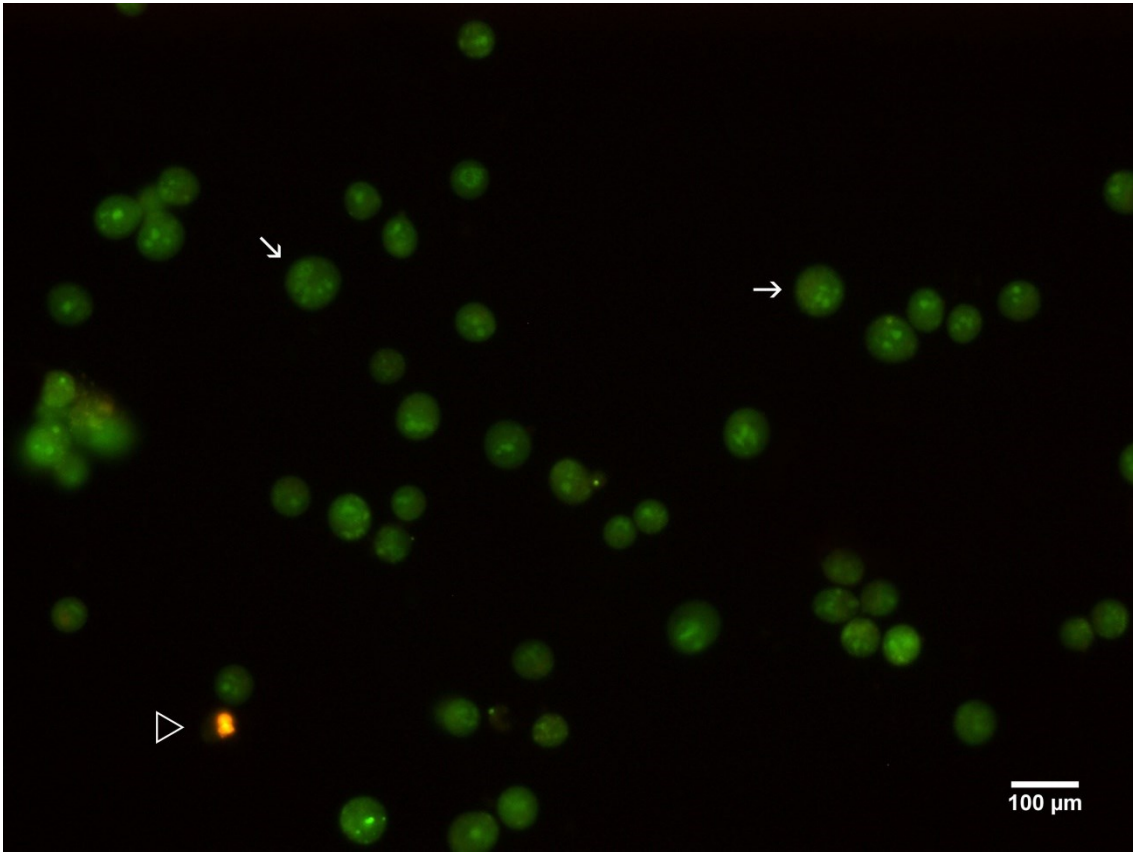
4.2. APOPTOTİK ETKİ BULGULARI

4.2.1. Akridin Turuncusu/ Etidyum Bromür (AO/EtBr) Yöntemi Bulguları

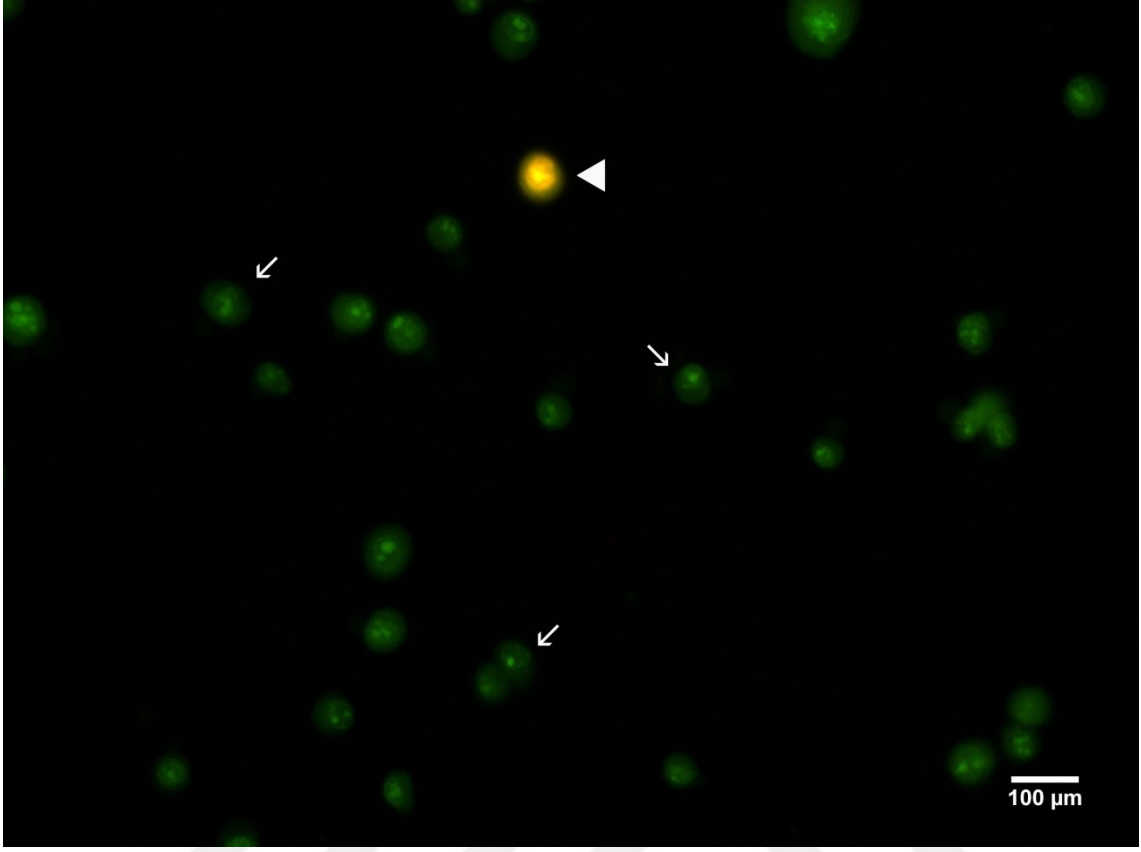
Flumetrinin 1, 10, 100 ve 1000 μM dozlarına 24 saat süre ile maruziyet sonrasında AO/EtBr boyaması ile elde edilen hücreler floresan mikroskobu ile sayılmış erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz olan hücrelerin bulunma sıklıkları belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre 100 μM ve 1000 μM flumetrin uygulanan gruplarda geç apoptoz sayısı anlamlı derecede artış göstermiştir. Tablo 4.1’de kontrol ve deney gruplarının apoptoz ve nekroz yüzdeleri verilmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki apoptotik ve nekrotik hücre görünimleri şekil 4.5-4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4. 1: Kontrol ve deney gruplarının apoptoz ve nekroz hücre yüzdeleri (kontrole göre *:p<0,01; **:p<0,0001)

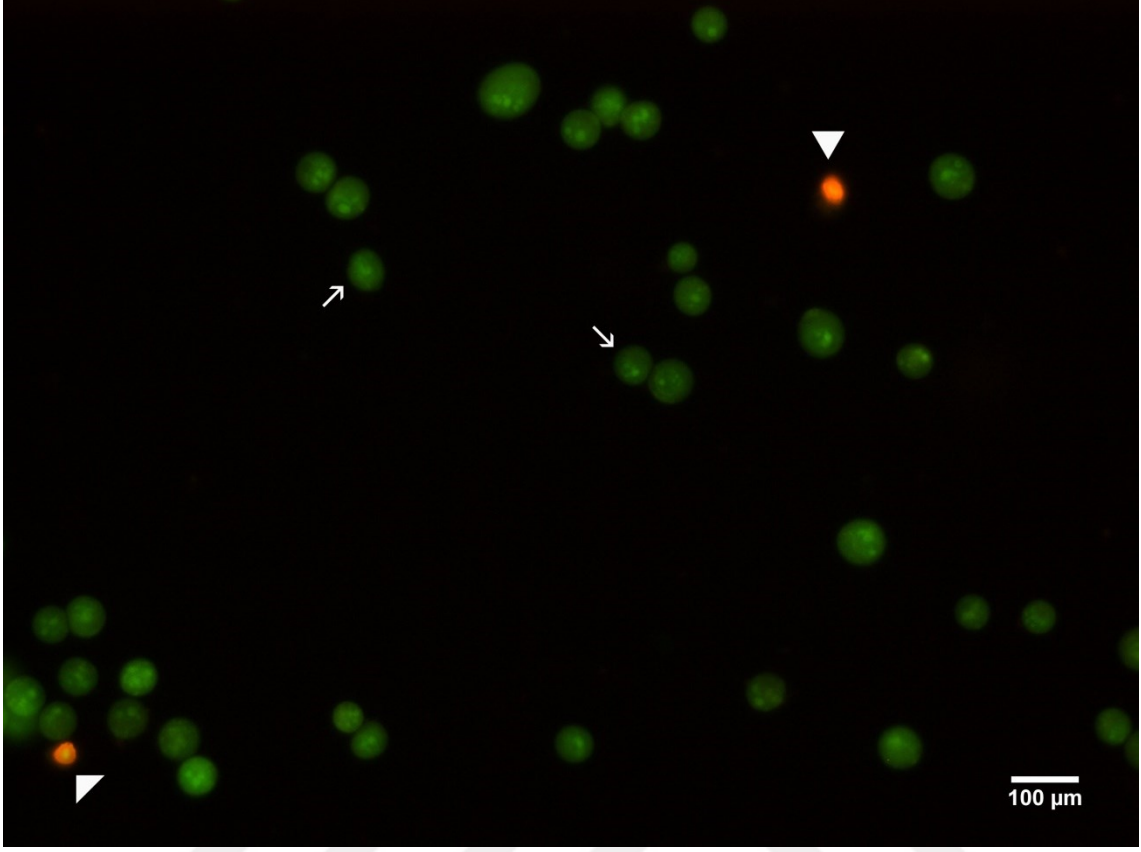
	Kontrol	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1000 μ M
Canlı hücre %	92,6 $\pm$ 1,43	89,9 $\pm$ 0,80	84,6 $\pm$ 1,77*	71,8 $\pm$ 1,93**	66,0 $\pm$ 2,47**
Erken apoptoz %	3,0 $\pm$ 0,31	3,4 $\pm$ 0,51	5,6 $\pm$ 0,927	6,0 $\pm$ 1,095	7,2 $\pm$ 1,02
Geç apoptoz %	3,2 $\pm$ 0,37	5,0 $\pm$ 0,89	6,0 $\pm$ 1,0	19,4 $\pm$ 1,47**	22,6 $\pm$ 2,58**
Nekroz %	1,4 $\pm$ 0,245	1,4 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,374	2,8 $\pm$ 0,583	4,2 $\pm$ 1,241



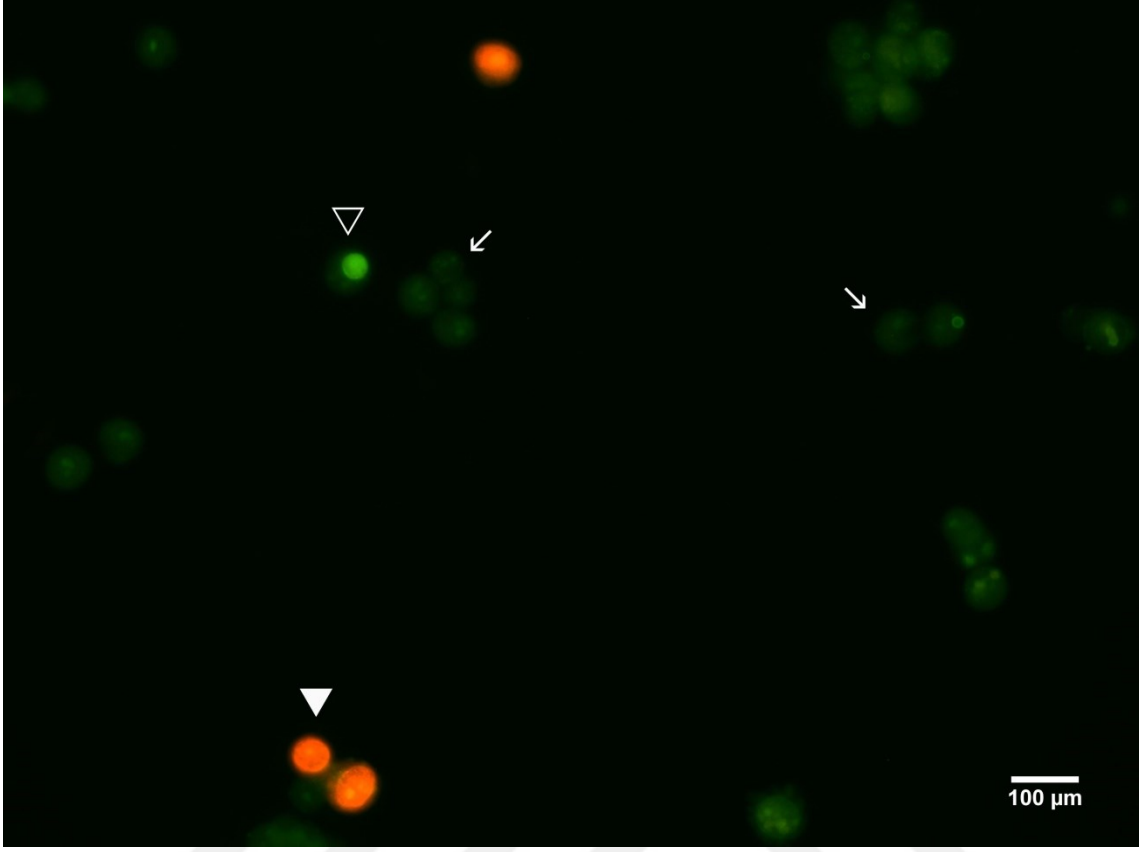
Şekil 4. 5: Kontrol grubunda AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünimleri. →: canlı hücreler, ▷: erken apoptotik hücreler.



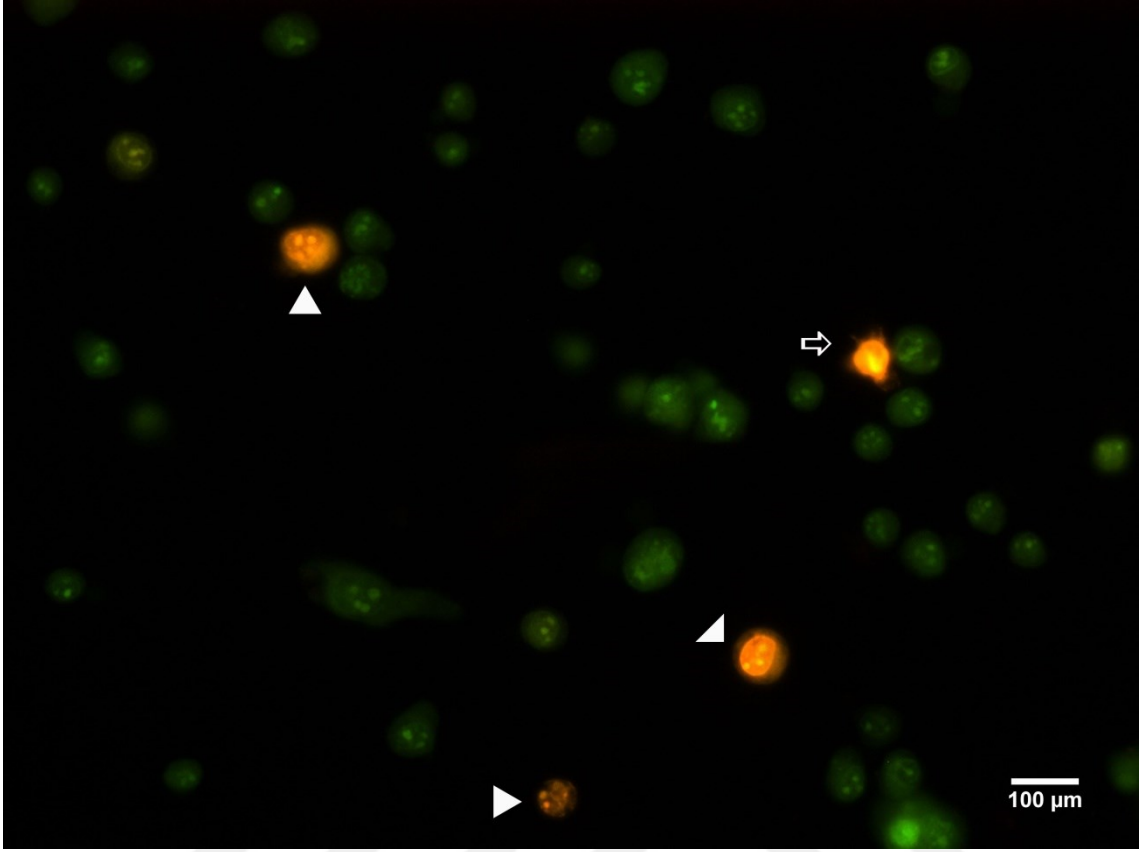
Şekil 4. 6: 1 μ M flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. →: canlı hücreler, ►: geç apoptotik hücreler.



Şekil 4. 7: 10 µM flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünimleri. →: canlı hücreler, ►: geç apoptotik hücreler.



Şekil 4. 8: 100 μ M flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. $\rightarrow$: canlı hücreler, $\triangleright$: erken apoptotik hücreler, $\blacktriangleright$: geç apoptotik hücreler.

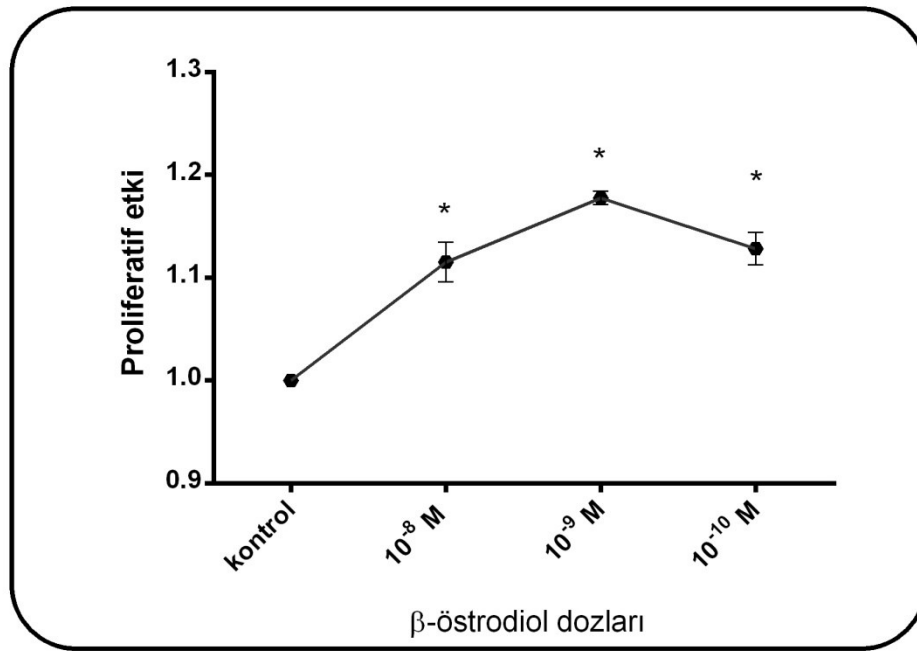


Şekil 4. 9: 1000 μ M flumetrin uygulanan gruptaki AO/EtBr boyanması sonucu hücre görünüşleri. $\rightarrow$: canlı hücreler, $\blacktriangleright$: geç apoptotik hücreler, $\Rightarrow$: nekrotik hücreler.

4.3. ÖSTROJENİK ETKİ BULGULARI

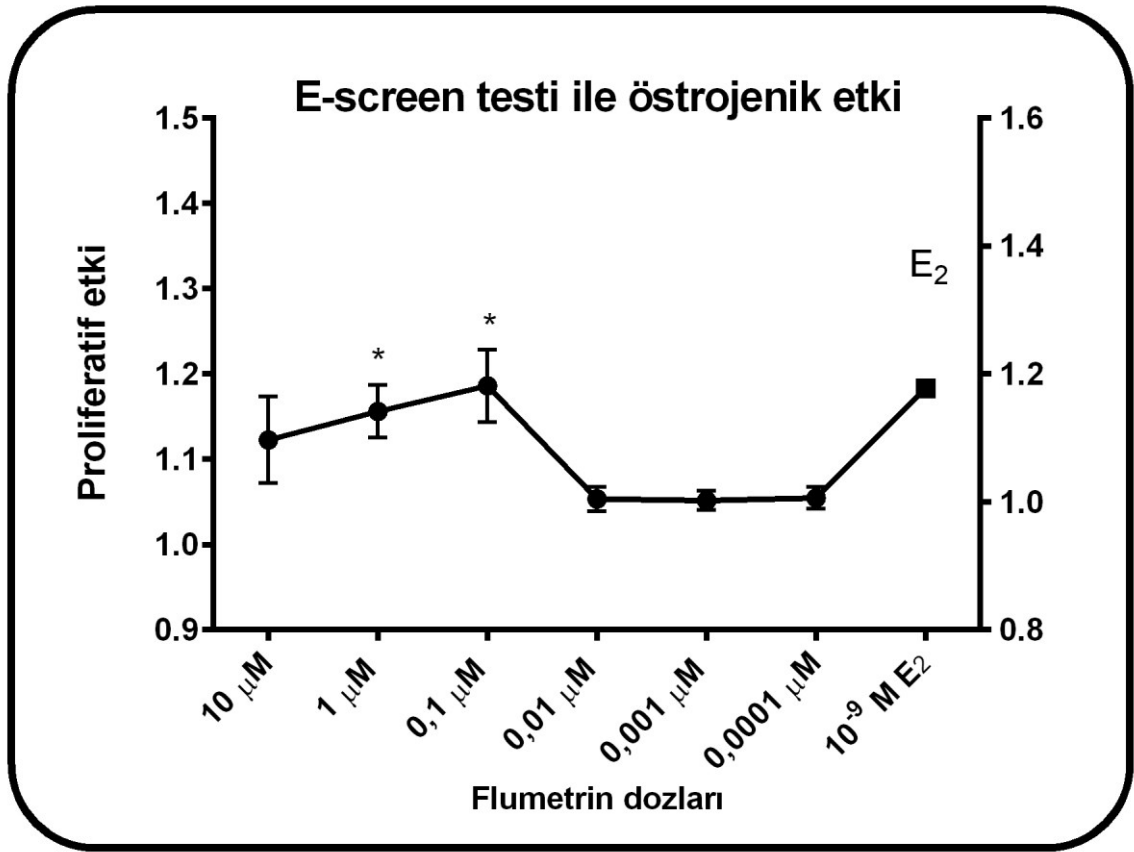
4.3.1. E-screen yöntemi bulguları

Hücre proliferasyonu 144 saat uzatılmış maruziyet sonrasında hücrelerdeki total protein içeriğinin spektrofotometrik olarak belirlendiği Sülfordamin B (SRB) yöntemiyle değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılacak östrojen dozunun belirlenmesi için β -östrodiolün 3 farklı dozu denenmiş ve 10^{-9} M dozu en fazla proliferatif etkiyi gösterdiğinden pozitif kontrol olarak seçilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10: β -östrodiol'ün 144 saat maruziyeti sonrasında MCF-7 hücreleri üzerine proliferatif etkisi (*: $p < 0,001$)

Flumetrinin 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M ve 0,0001 μ M dozları MCF-7 hücrelerine 144 saat süre ile uygulanmış ve spektrofotometrik olarak SRB yöntemi proliferatif etkisi (PE) hesaplanmıştır (Şekil 4.11). Flumetrinin 1 ve 0,1 μ M dozlarında kontrole göre proliferatif etkide anlamlı artış gözlenmiştir. Östrojene göre proliferatif etki değerlerine göre hesaplanan göreceli proliferatif etki (RPE) sonuçları tablo 4.2'de gösterilmiştir. Göreceli proliferatif etki sonuçlarına göre flumetrinin 10 μ M, 1 μ M ve 0,1 μ M dozlarının östrojene parsiyel agonist olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 11: Flumetrinin 144 saat maruziyeti sonrasında MCF-7 hücreleri üzerine kontrole göre proliferatif etkisi (*: p<0,001)

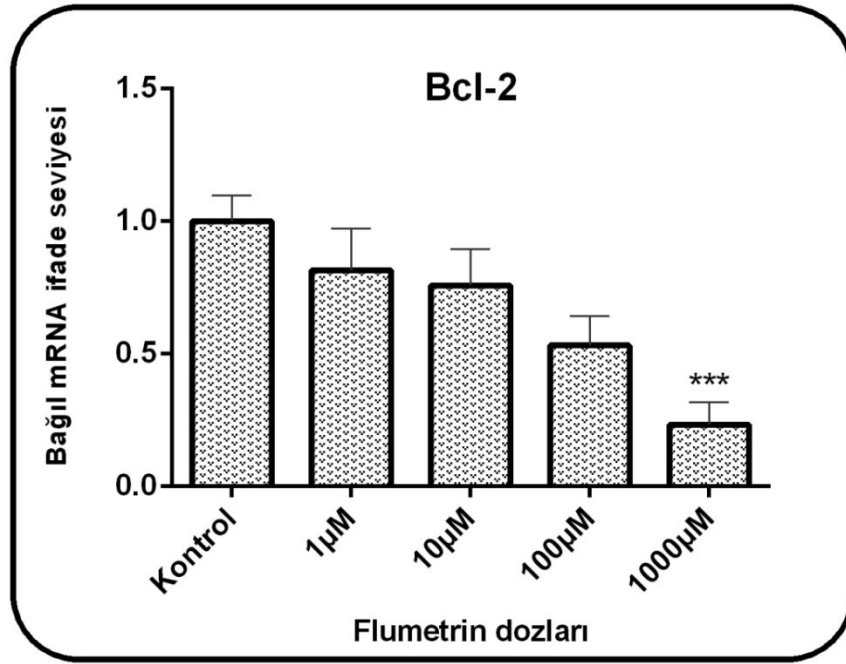
Tablo 4. 2: Uygulanan flumetrin dozlarının β-östrodirole göre belirlenen göreceli proliferatif etkisi (RPE)

FLUMETRİN DOZLARI	10 µM	1 µM	0,1 µM	0,01 µM	0,001 µM	0,0001 µM
RPE	69,101±,05	77, 528±,04	80,898±,01	2,808 ±,01	1,685± ,01	3,370±,01

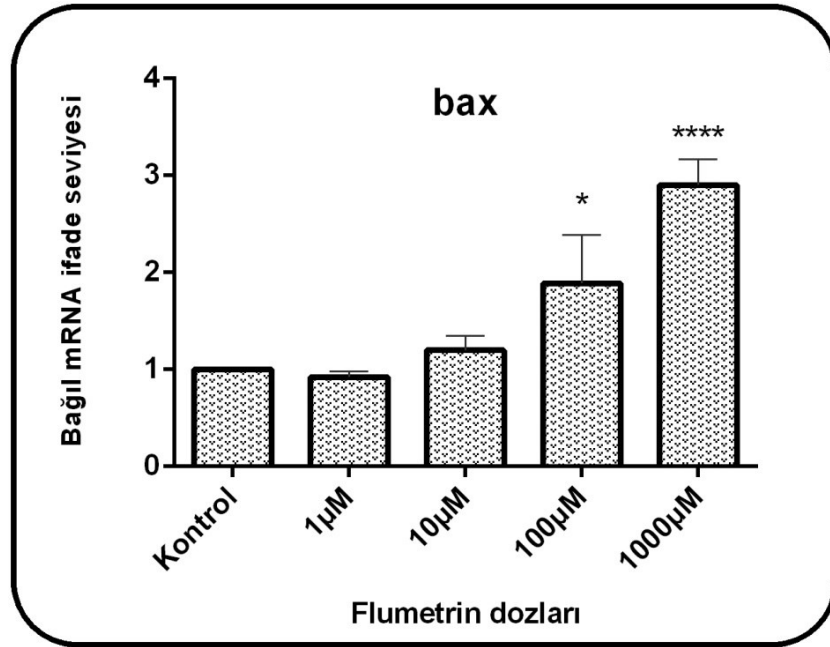
4.4. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) BULGULARI

Flumetrinin, apoptoz yolağı ile ilişkili genler (bcl-2, bax, p53 ve p21) ve östrojen ile stimüle edilen genlerin (ps2, ER α , ER β ve PGR) ifade düzeyi üzerindeki etkileri MCF-7 hücrelerinde SYBR Green I floresans boyası ile RT-PCR kullanılarak belirlenmiştir. Apoptoz yolağı ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi için 24 saat süre ile 1, 10, 100 ve 1000 μ M flumetrin maruziyeti sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı ve anlamsız bulgular elde edilmiştir. Benzer şekilde, MCF- 7 hücrelerinde östrojen ile stimüle edildiği bilinen pS2 geni, östrojen reseptör genleri (Er α ve Er β) ve progesteron reseptör genlerinin (PGR) ifade düzeyleri için 48 saat süre ile 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M flumetrin maruziyeti yapılmış olup sadece DMSO içeren negatif kontrol grubuna ve 10^{-9} M β -östrodiol pozitif kontrol grubuna göre değerlendirme yapılmıştır. Tüm sonuçlar referans gen olarak kullanılan GAPDH'e göre normalize edilmiştir.

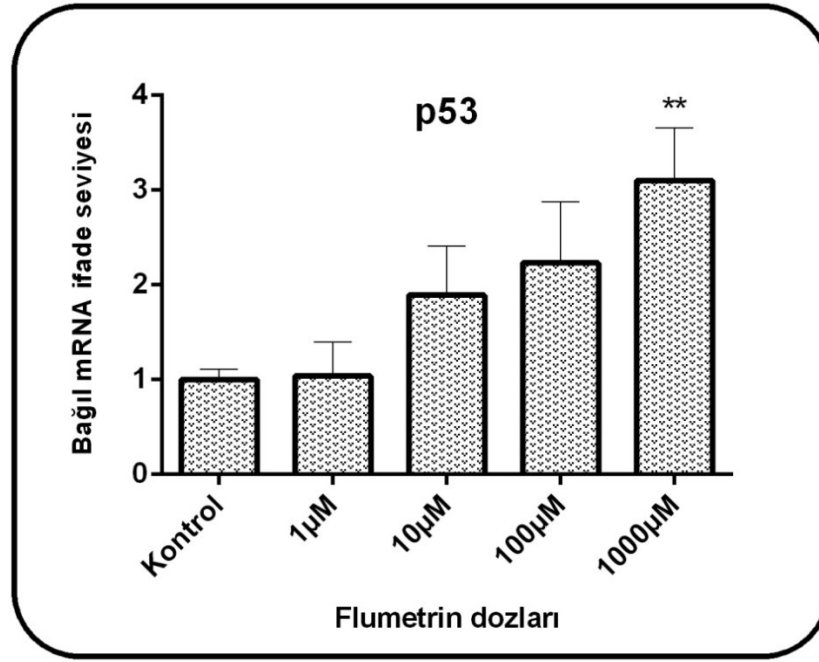
Flumetrin uygulanan deney gruplarına ait örneklerin kontrole mRNA ifade seviyesindeki değişimler şekil 4.12-4.19 verilmiştir.



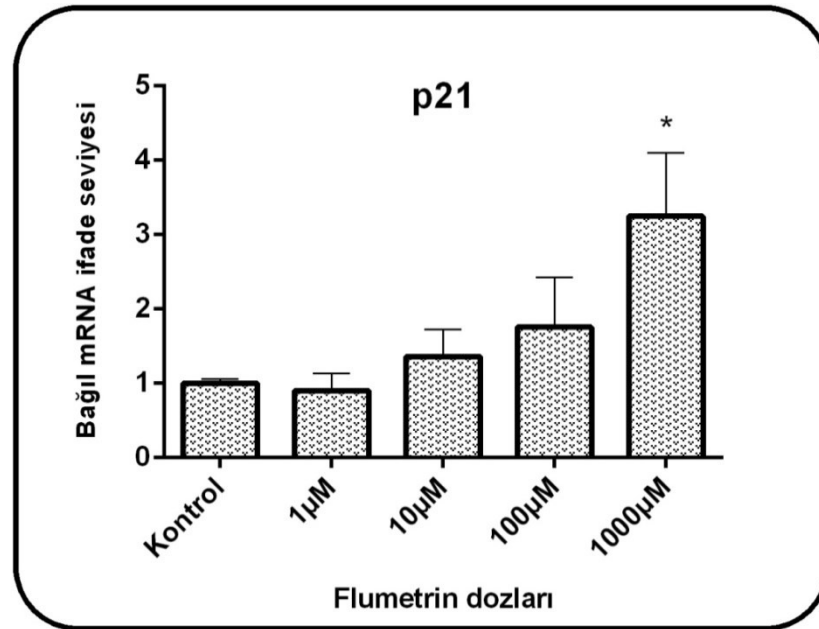
Şekil 4. 12: Flumetrimin MCF-7 hücreleri üzerinde Bcl-2 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (***, $p < 0,001$).



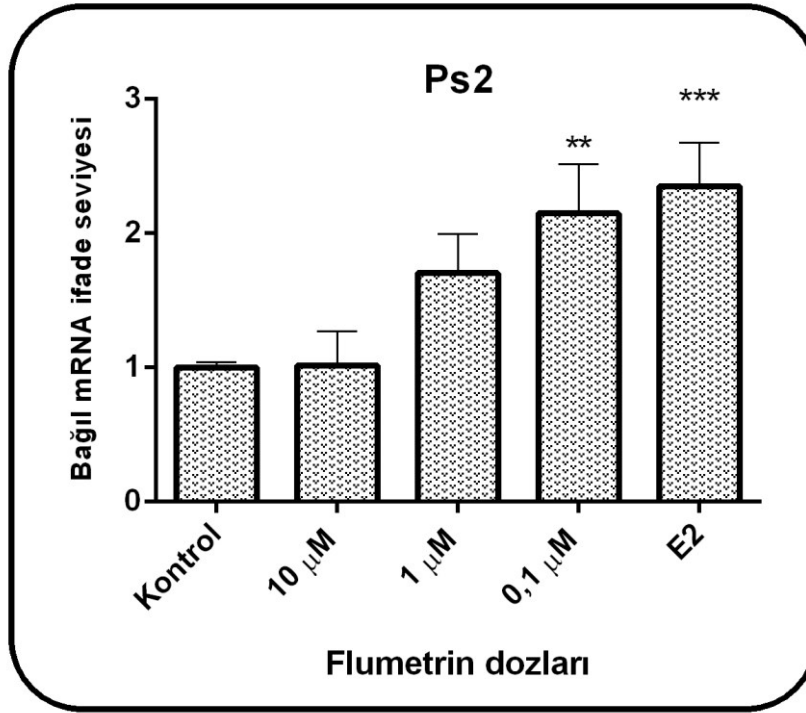
Şekil 4. 13: Flumetrimin MCF-7 hücreleri üzerinde Bax geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (****: $p < 0,0001$, *: $p < 0,05$).



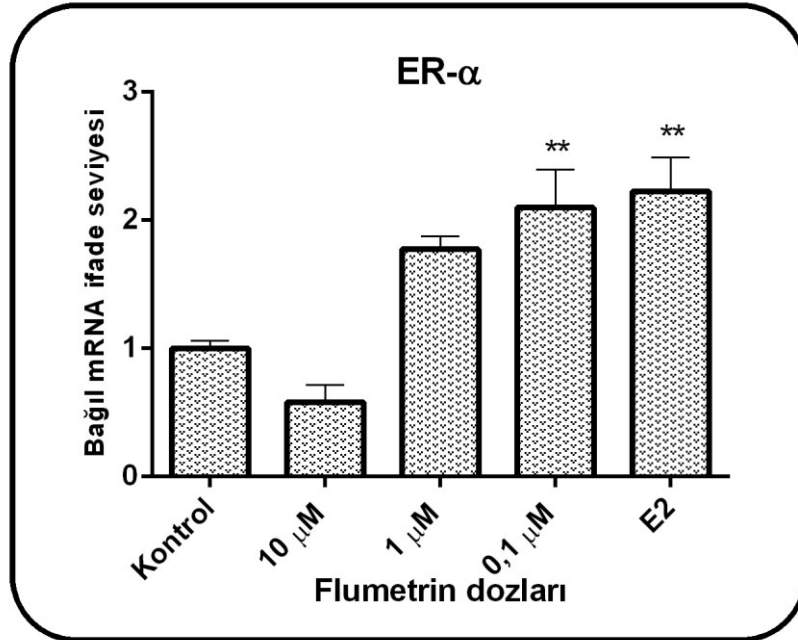
Şekil 4. 14: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde p53 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$).



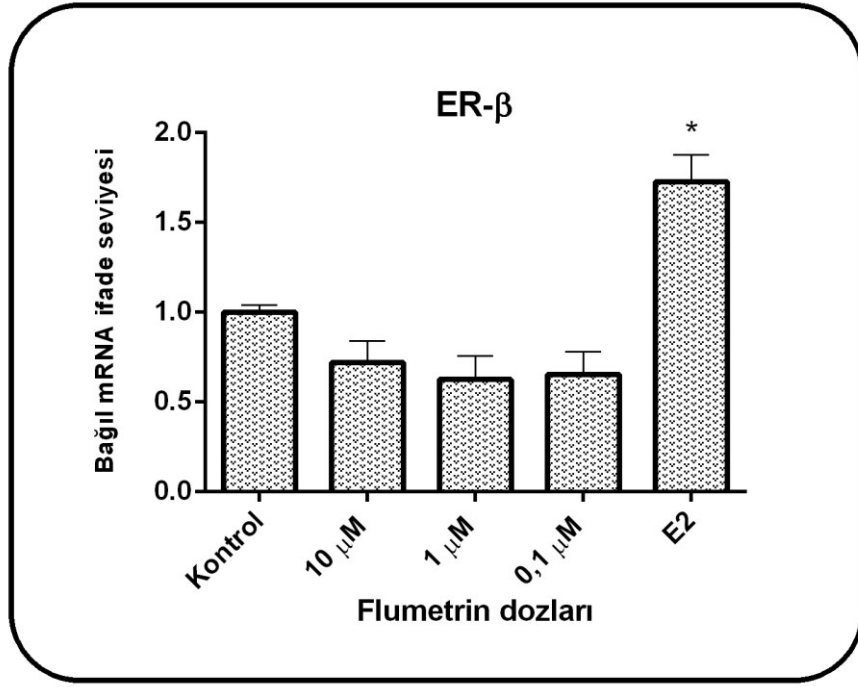
Şekil 4. 15: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde p21 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).



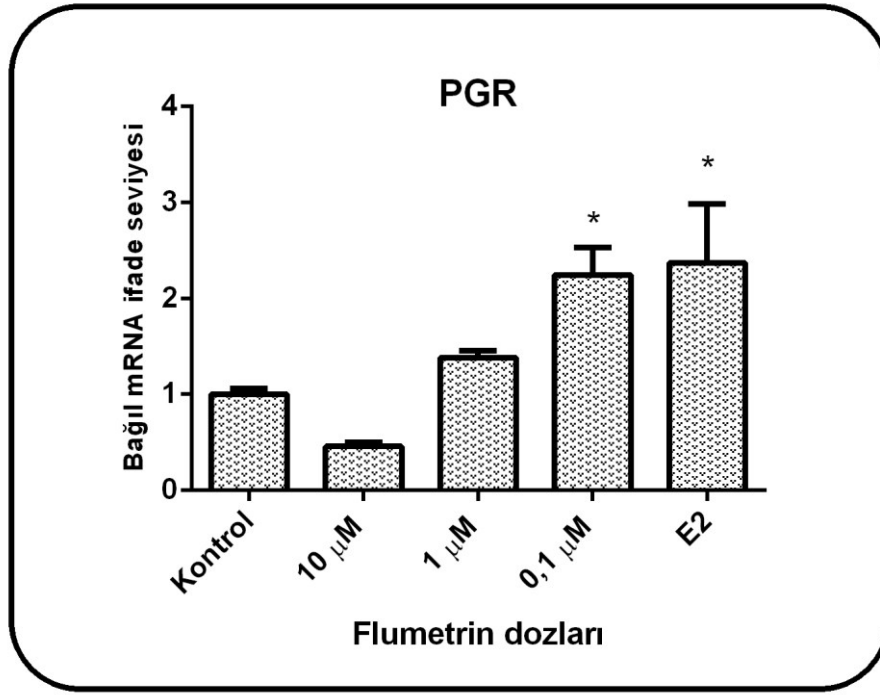
Şekil 4. 16: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde pS2 geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).



Şekil 4. 17: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde ER-α geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**: $p < 0,01$).



Şekil 4. 18: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde ER-β geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).



Şekil 4. 19: Flumetrinin MCF-7 hücreleri üzerinde PGR geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*: $p < 0,05$).

4.5. GENOTOKSİSİTE BULGULARI

4.5.1. Mikronükleus Yöntemi Bulguları

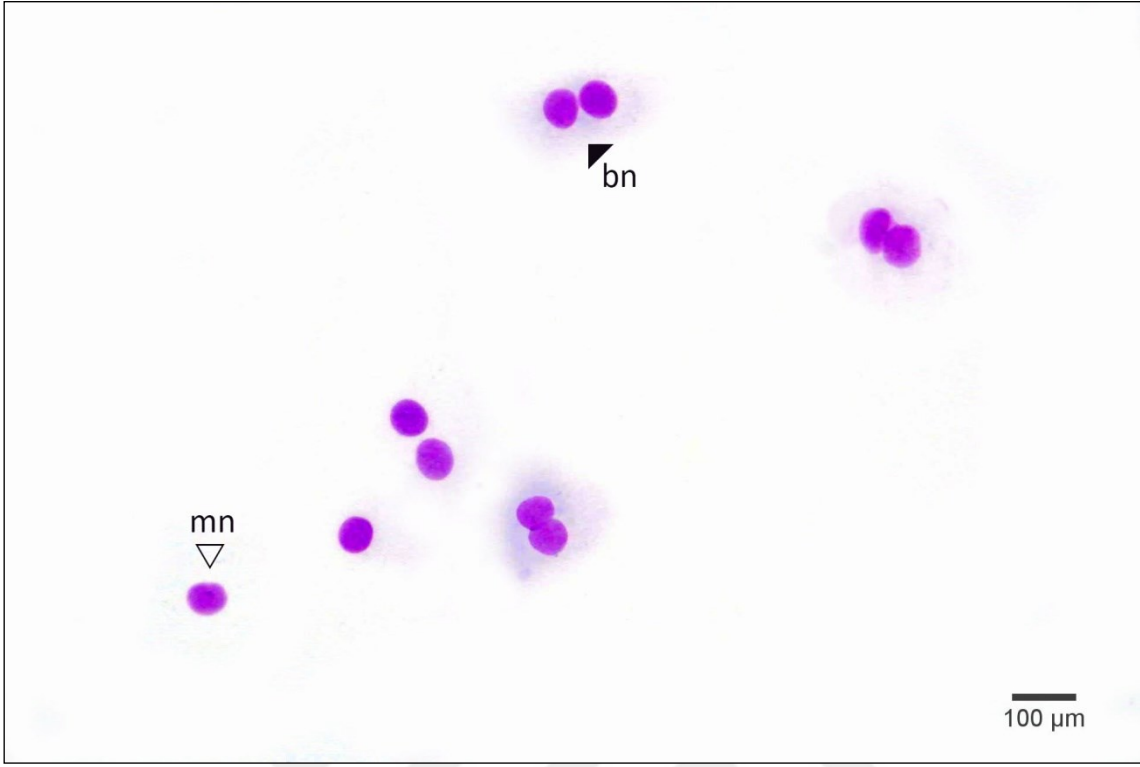
MCF-7 hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında sitokinez bloklu mikronükleus yöntemi ile oluşturulan binükleat hücrelerin sayımı sonrasında bulunan mikronükleus sayılarının ve nüklear abnormalitelerin oranları tablo 4.3’de gösterilmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki mikronükleus oluşumları şekil 4.20-4.24’de gösterilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde oluşturulan binükleat hücrelerde mikronükleus oranları kontrole göre değerlendirildiğinde 1µM ve üzerindeki flumetrin dozlarında anlamlı artış, oluşan nüklear budlar değerlendirildiğinde 10µM ve üzeri dozlarda anlamlı artış belirlenmiştir. Nüklear köprü açısından yapılan değerlendirme sonucu ise 100µM ve üzeri dozlarda kontrole göre anlamlı artış görülmüştür.

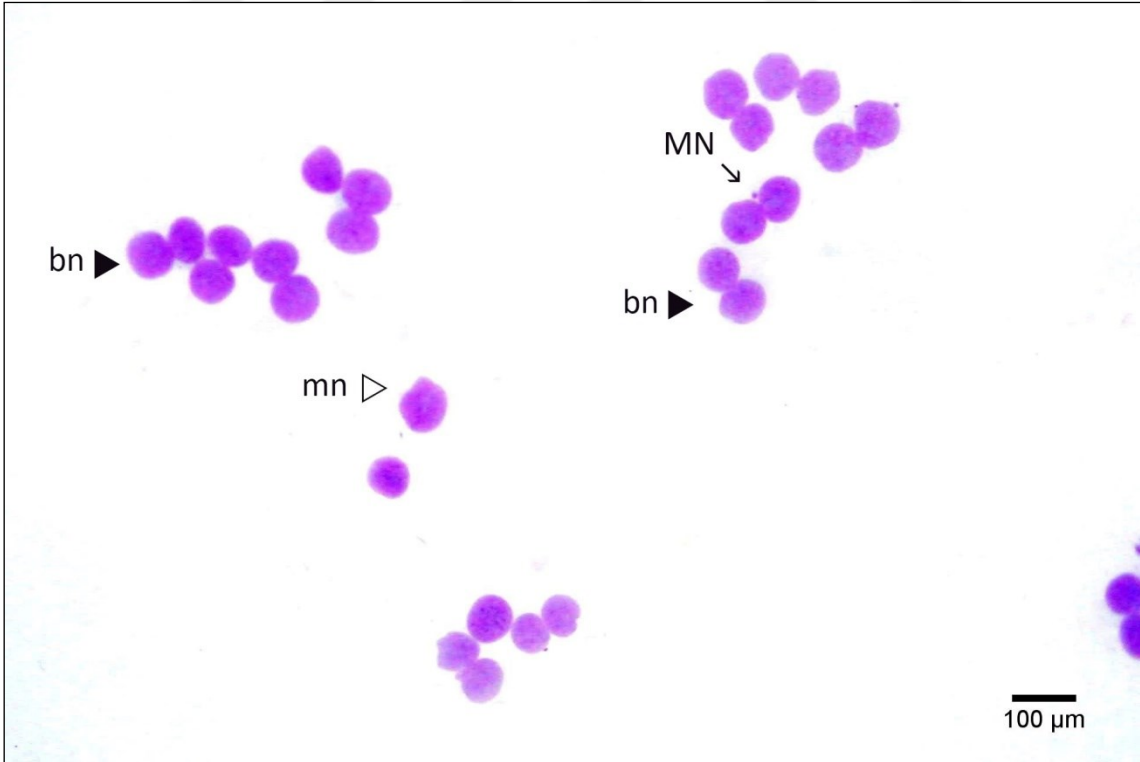
MCF-7 hücrelerinde kontrol ve deney gruplarının nüklear bölünme indeksi (NDI) hesaplamaları sonrasında bulunan değerler tablo 4.3’de gösterilmiştir. NDI açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo 4. 3: Kontrol ve flumetrin uygulanan deney gruplarında mikronükleus, nüklear bud ve nüklear köprü oluşumları (*:p<0,001, **: p< 0,0001, +:p<0,05, ++:p<0,01)

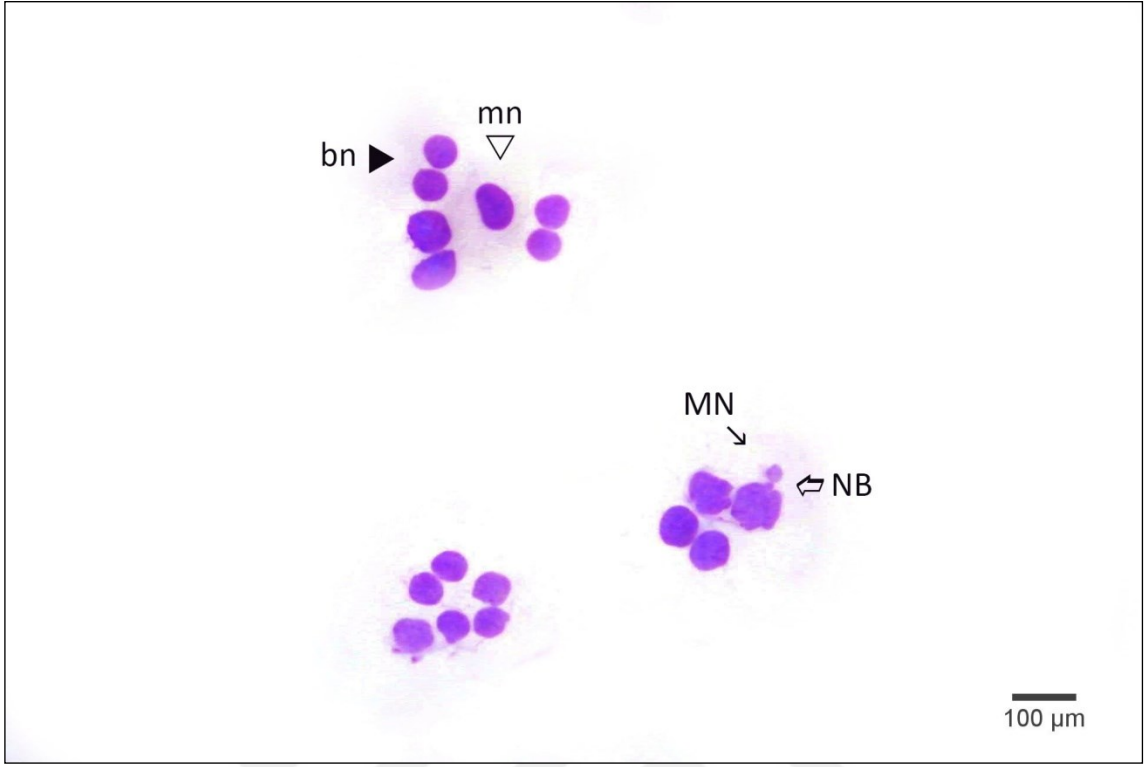
(%)	Kontrol	1 µM	10 µM	100 µM	1000 µM
Mikronükleus	1,83±0,1	4,483±0,2*	5,025±0,4*	5,2 ±0,7**	6,767±0,3**
Nüklear bud	0,7867±0,1	1,383±0,2	1,840±0,3 ⁺	1,960±0,2 ⁺	1,934±0,2 ⁺⁺
Nüklear köprü	0,8971±0,1	1,348±0,1	1,433±0,3	1,767±0,2 ⁺	1,880±0,2 ⁺⁺
Nüklear bölünme indeksi	1,586±0,6	1,560±0,3	1,686±0,7	1,658±0,4	1,660±0,4



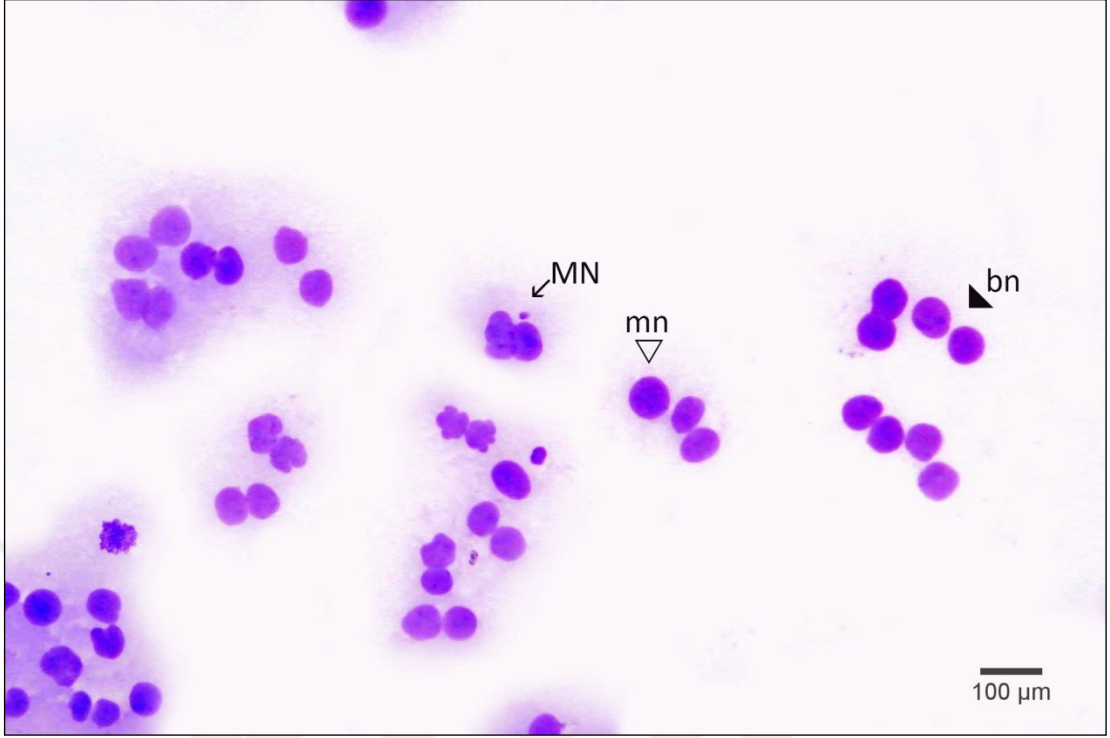
Şekil 4. 20: Kontrol grubunda sitokinez bloklı binükleat hücre görünümleri.



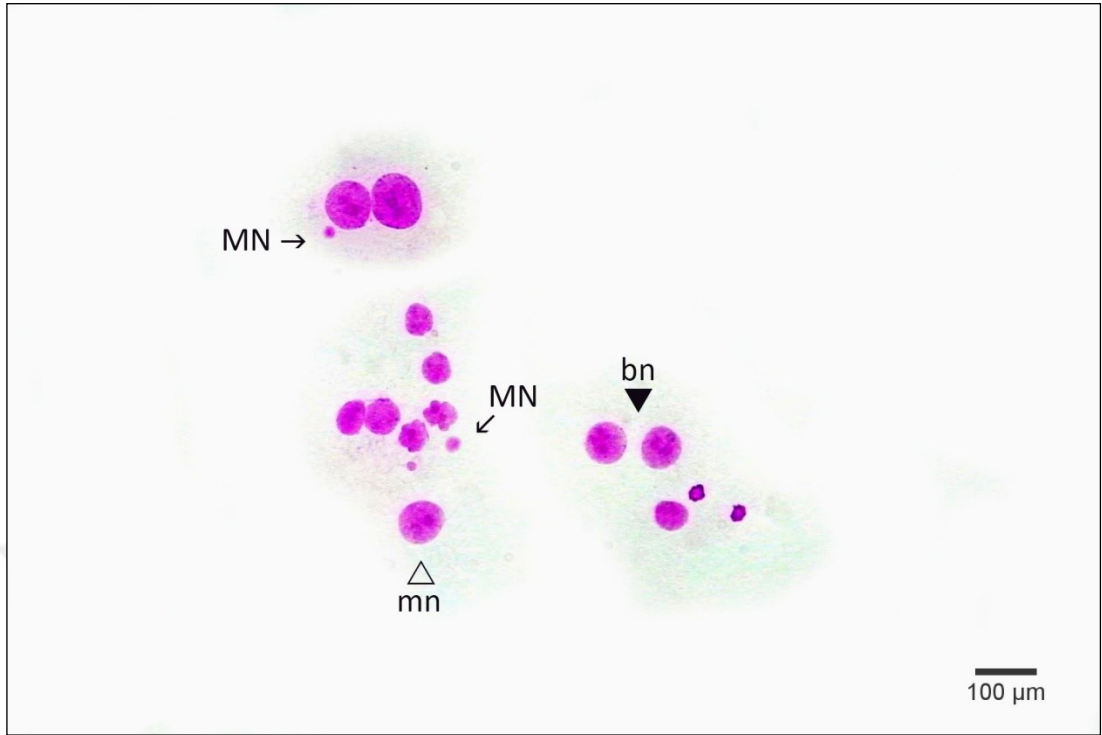
Şekil 4. 21: 1 μM flumetrim uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümleri. MN: mikronükleus, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.



Şekil 4. 22: 10µM flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümleri. MN: mikronükleus, NB: nüklear bud, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.



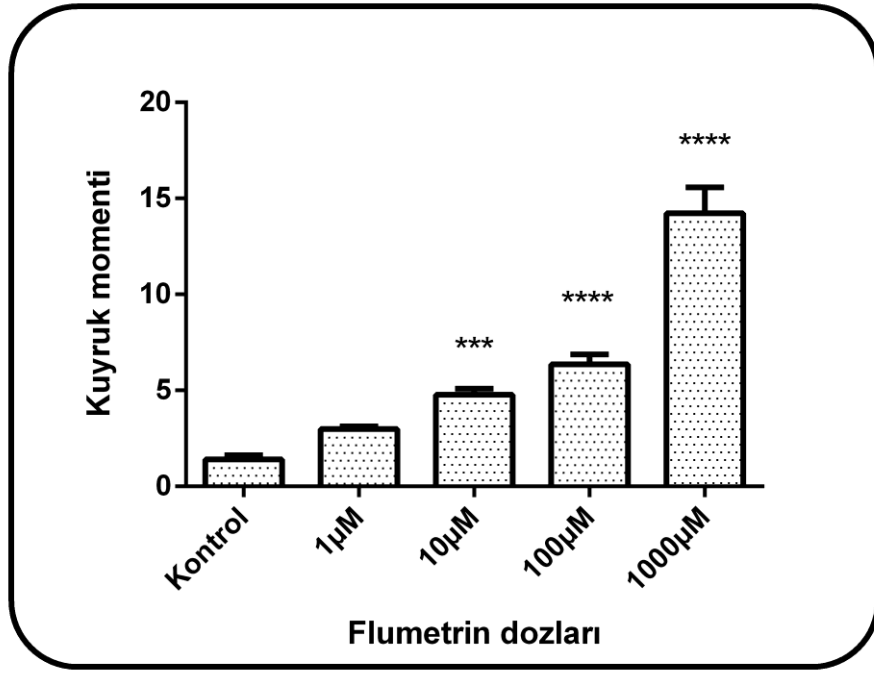
Şekil 4. 23: 100μM flumetrin uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünümleri. MN: mikronükleus, NB: nükleer bud, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.



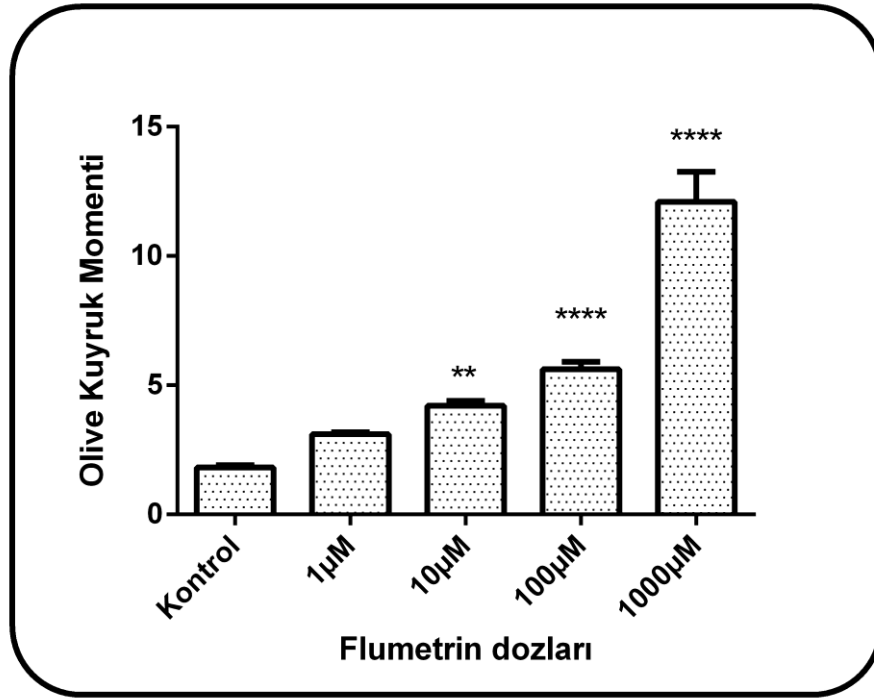
Şekil 4. 24: 1000 μ M flumetrim uygulanan deney gruplarında binükleat hücre görünüşleri. MN: mikronükleus, mn: mononükleat hücre, bn: binükleat hücre.

4.5.2. Komet Testi Bulguları

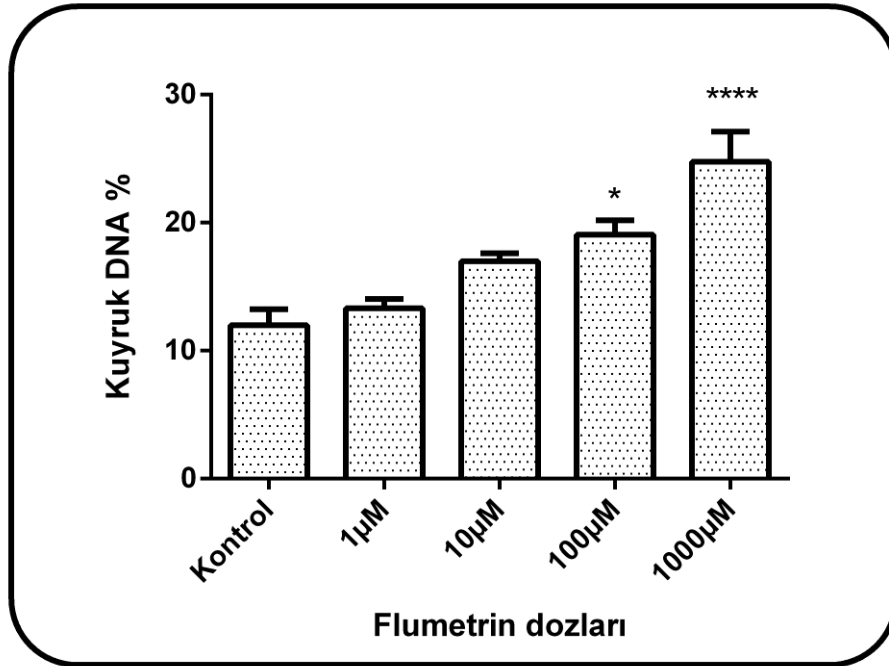
MCF-7 hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında oluşturulan Komet hücrelerinin kuyruk momenti, Olive kuyruk momenti, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk uzunlukları değerlendirilmiştir. Kuyruk momenti, Olive kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede, 10 μ M ve üzerindeki dozlarda kontrole göre doza bağlı artış gözlenmiştir. Kuyruk DNA yüzdesi değerlerinde ise 100 μ M ve üzeri dozlarda anlamlı artış bulunmuştur. Kontrol ve deney gruplarındaki değişimleri gösteren grafikler şekil 4.25-4.28 ile gösterilmiştir. Kontrol ve deney gruplarına ait komet hücrelerinin görünümü Şekil 4.29-4.34'de verilmiştir.



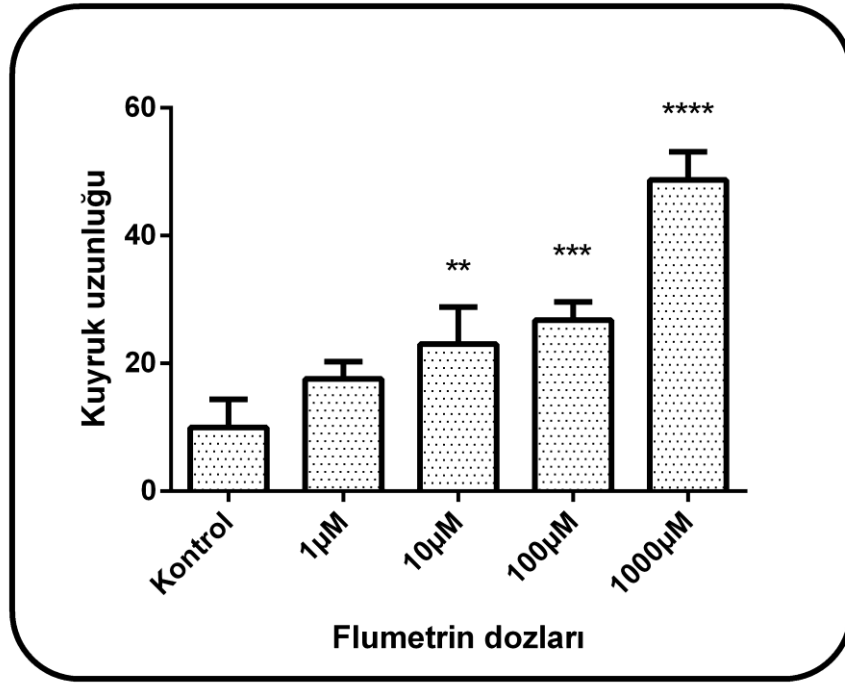
Şekil 4. 25: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk momentı değeri (***:p<0,01; **** p<0,0001)



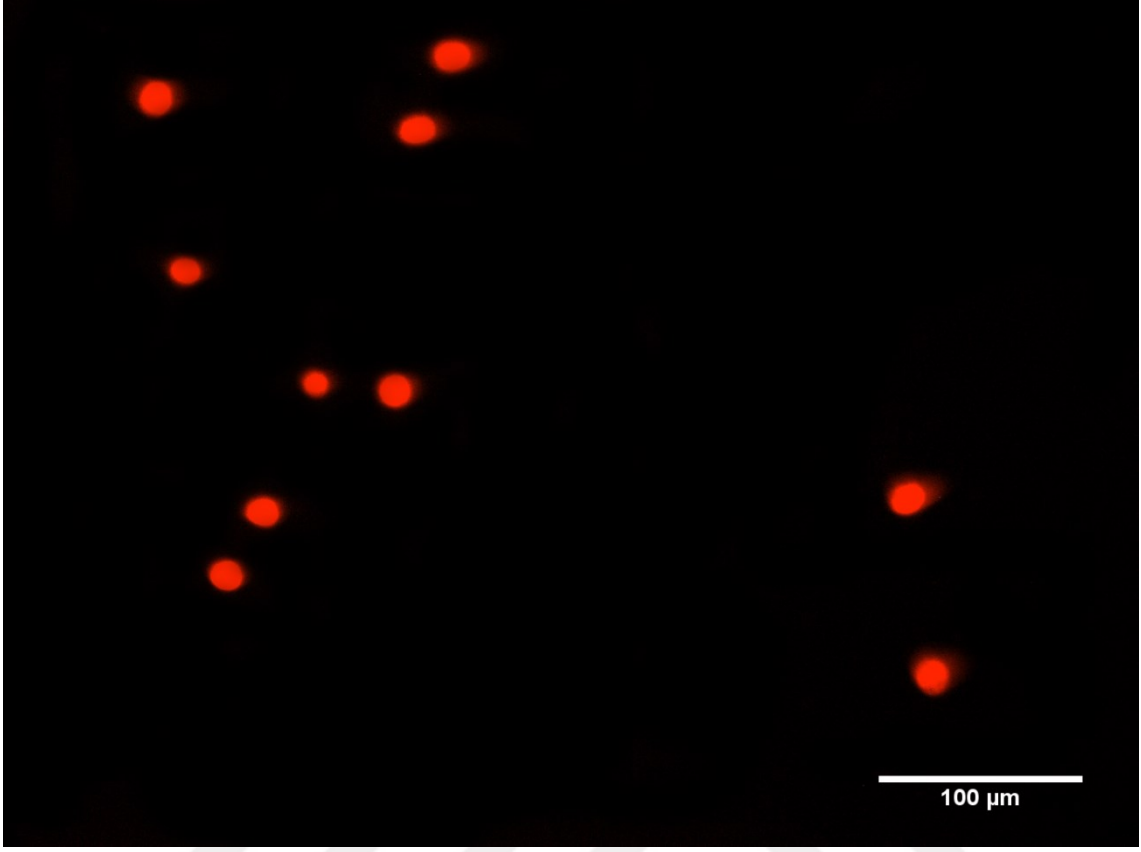
Şekil 4. 26: Kontrol ve deney gruplarında olive kuyruk momenti değerleri (**:p<0,01; ****: p<0,0001)



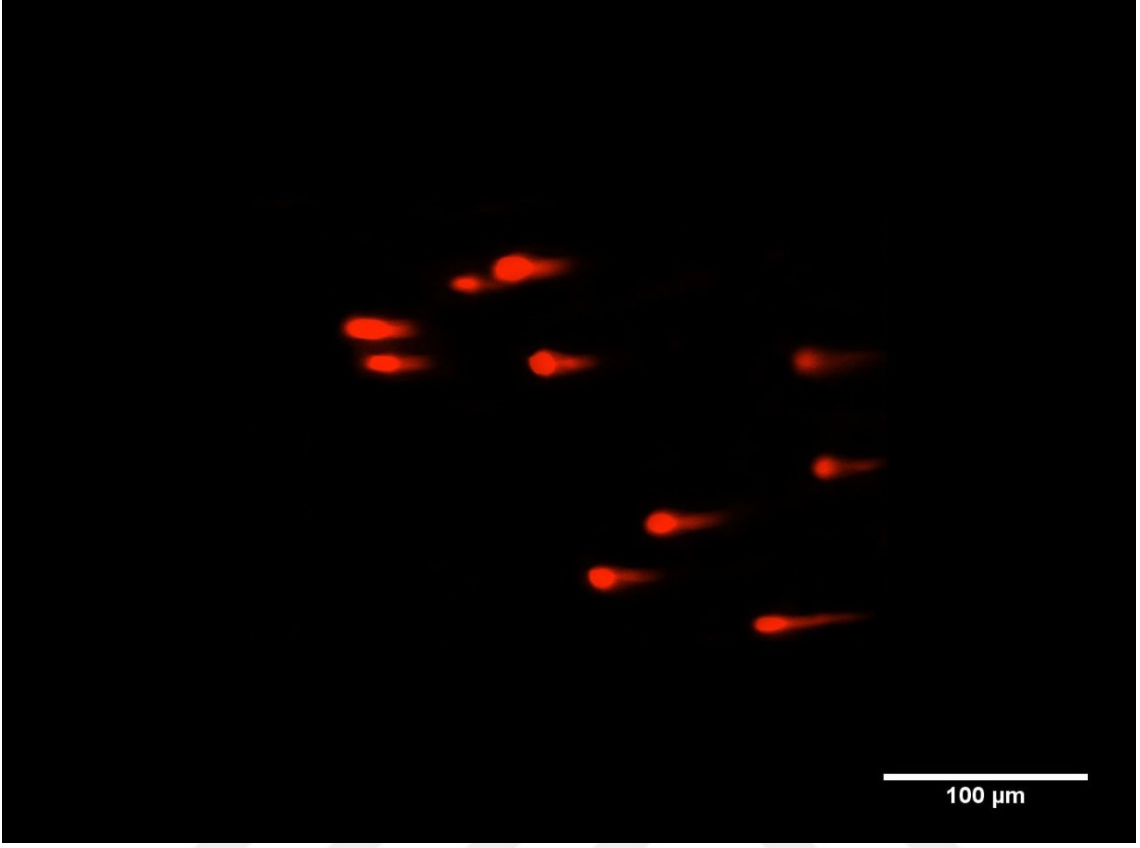
Şekil 4. 27: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk DNA %'si değerleri (*:p<0,05; ****: p<0,0001)



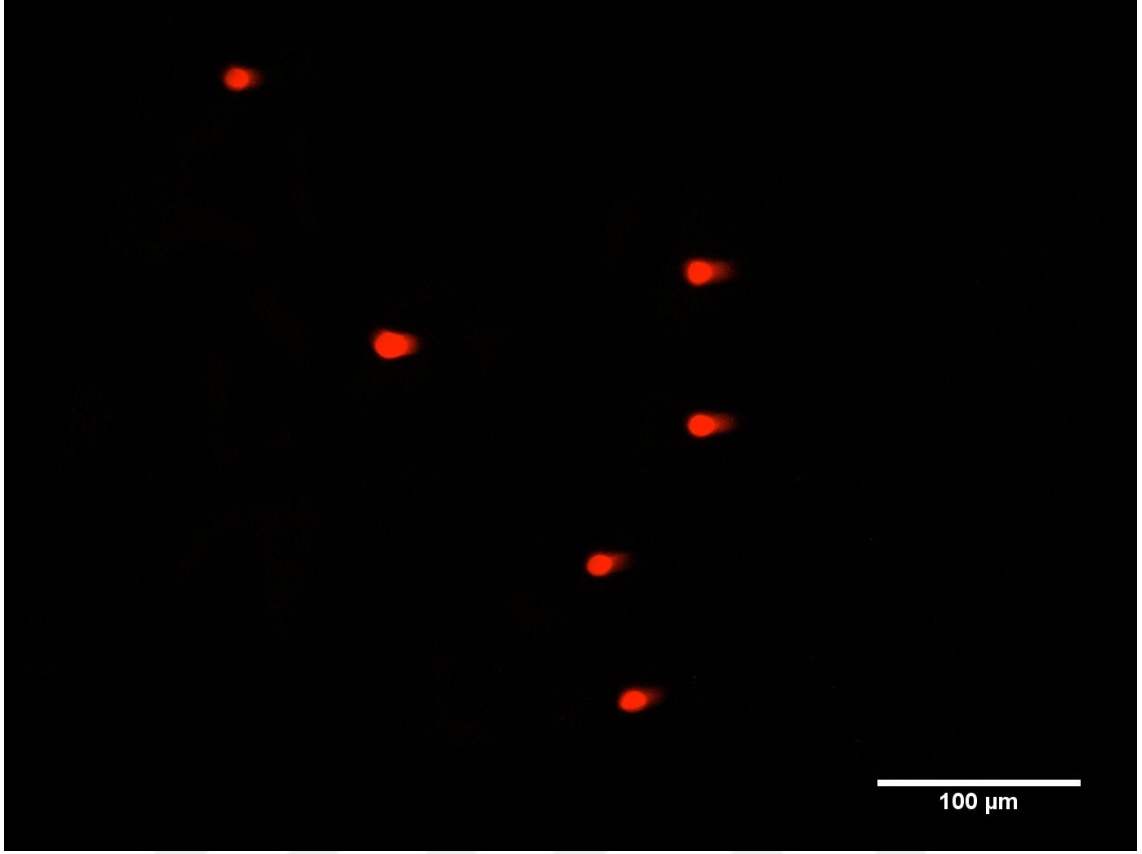
Şekil 4. 28: Kontrol ve deney gruplarında kuyruk uzunluğu değerleri (**: $p < 0,01$ - ***: $p < 0,001$ - ****: $p < 0,0001$)



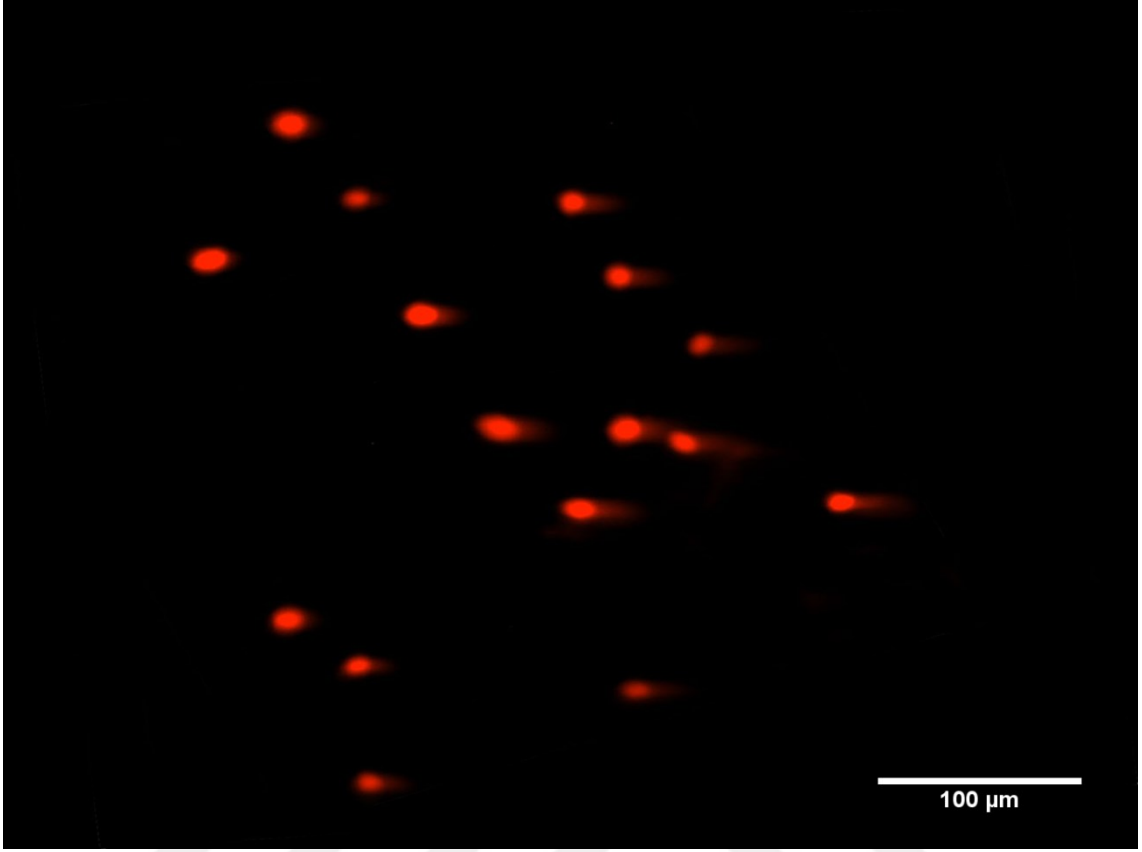
Şekil 4. 29: Kontrol grubu hücrelerinin komet görüntüsü



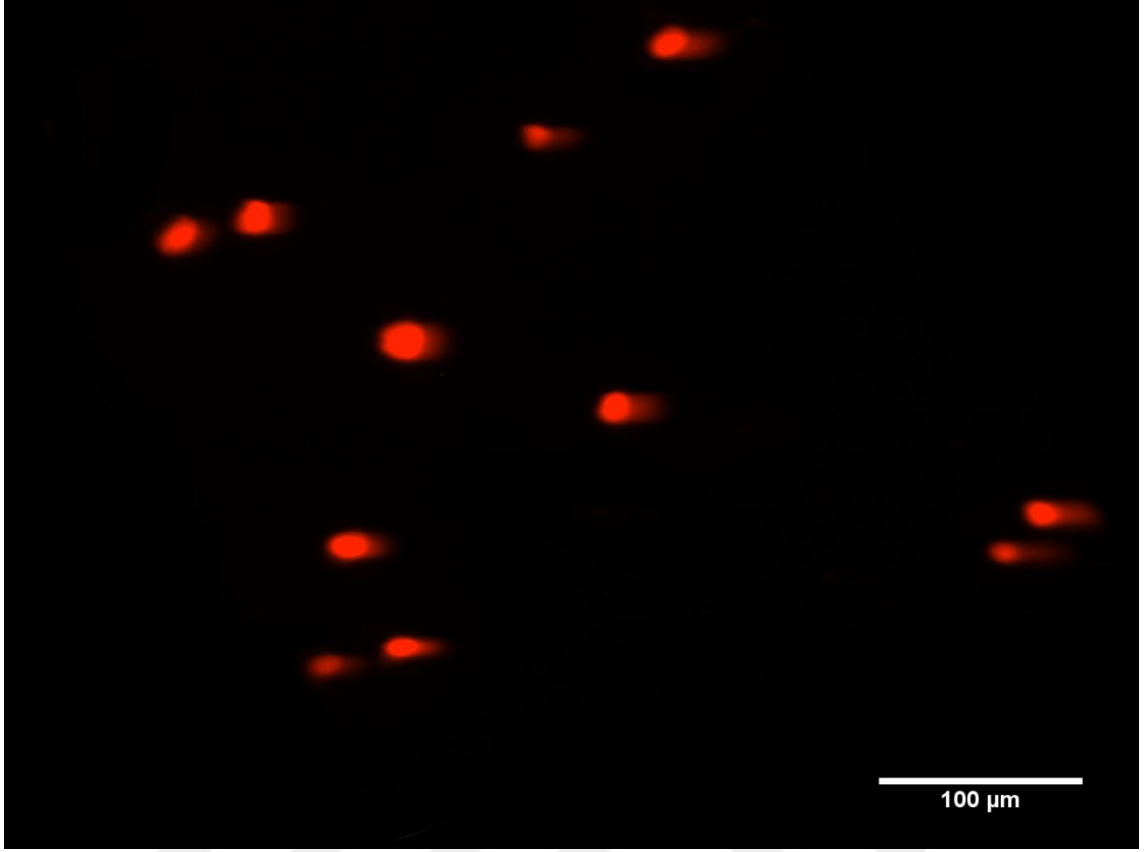
Şekil 4. 30: H₂O₂ uygulanan pozitif kontrol hücrelerinin komet görüntüsü



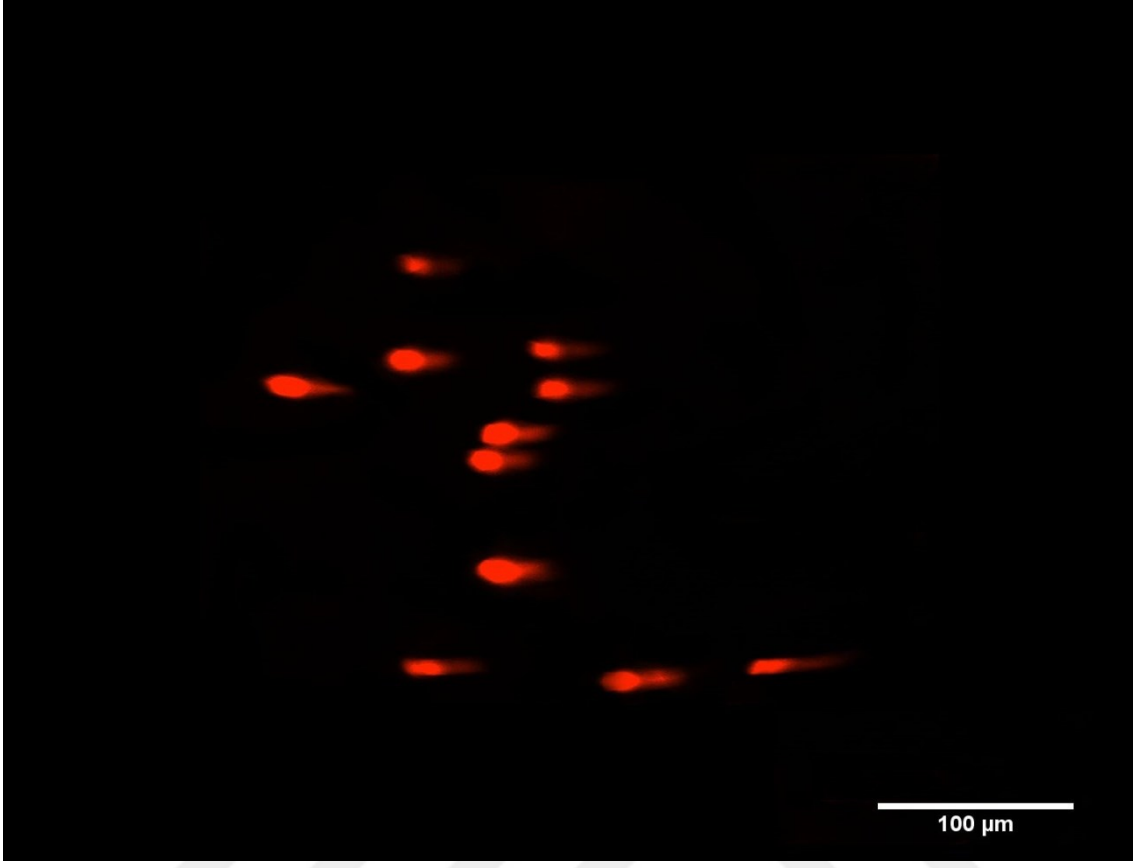
Şekil 4. 31: 1µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü



Şekil 4. 32: 10µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü



Şekil 4. 33: 100µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü



Şekil 4. 34: 1000µM Flumetrin uygulanan hücrelerinin komet görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Piretroid pestisitler tarımda, veterinerlikte ve günlük yaşam alanlarında insektlerin kontrolü için sıklıkla kullanılmaktadır. 1980'li yıllardan bu yana Dünya'da organofosfat ve karbamat gibi diğer insektisitlere göre yüksek etkinlik ve düşük toksisitesi nedeniyle kullanılan piretroidler, doğal piretrinden sentetik olarak üretilerek pestisitlerin üç temel grubundan birini oluşturmaktadırlar. Sentetik piretroidler, piretrinlerin insektisidal aktivitesi korunarak, fiziksel ve kimyasal yapısında değişikliklerle ışığa karşı stabil kalmasını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Piretroidler diğer pestisitlerden aşırı hidrofobik oluşu, zengin sterokimyası (1-3 kiral merkez içermesi) ve geniş spektrumlu yüksek insektisidal aktivitesi ile karakterize özelliklere sahiptir (Braganca ve diğ., 2018; Tang ve diğ., 2018).

Piretroid pestisitlerin sık ve yanlış kullanımlarının bir sonucu olarak, uygulandıkları alanlarda hava, su, toprak ve yiyecek kirliliğine neden olmaktadır (Al-Sarar ve diğ., 2015; Djouaka ve diğ., 2018). Piretroidlere uzun süreli düşük doz maruziyet sinir sistemi, immün sistem, kardiyovasküler sistemde kronik hastalıklara neden olabilir ve teratojenite, karsinojenite ve mutajeniteyi içeren toksik etkiler oluşturabilir (Tang ve diğ., 2018). Ayrıca erkek ve dişi üreme sisteminde istenmeyen etkilere neden olabilmektedir (Tang ve diğ., 2018; Marettova ve diğ., 2017).

Flumetrin; deltametrin, sipermetrin ve cyhalotrin gibi doğal piretroidlerden türevlenmiş tip II grubu bir sentetik piretroidtir (Bissacot ve Vassilieff, 1997; Stanneck ve diğ., 2012b). 1986'da hayvanlar üzerindeki ektoparazitlere karşı sentezlenmiş olup halen çiftlik hayvanlarında ve kedi, köpek gibi evcil hayvanlarda oldukça sık kullanılmaktadır (Stanneck ve diğ., 2012b; Tan ve diğ., 2013). Veterinerlikte, topikal olarak %1 w/v dökme çözelti ve %6 w/v daldırma tekniği ile uygulanmaktadır (Mishra ve diğ., 2012b). Ayrıca, flumetrin uzun zamandır arıcılıkta Varroa akarlarının kontrolünde de yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tan ve diğ., 2013).

Flumetrin insektisit etkisini aksonlar üzerindeki voltaj kapılı sodyum kanallarına etki ederek gerçekleştirmektedir. Sodyum kanallarının kapanmasını geciktirerek iyon geçirgenliğinin uzun süre devam etmesine böylece depolarizasyonun kalıcı olmasına neden olmaktadır. Sonuçta, duyu nöronlarının organ ve kaslar üzerinde uzun süreli tekrarlayan uyarım oluşturmaları ile spazmlara ve ölümlere yol açmaktadır (Tan ve diğ., 2013; Mishra ve diğ., 2012b). Diğer taraftan, flumetrinin çeşitli deney hayvanlarında da toksik etkileri olduğu bulunmuştur.

Yapılan *in vivo* çalışmalar incelendiğinde, Flumetrinin altı gün boyunca sıçanlara 40mg/kg dozunda tekli ya da çoklu dozlarda intraperitoneal olarak uygulandığı ve flumetrin uygulanmasından 24 saat sonra antipirin uygulandığı grupların karşılaştırıldığı çalışmada, karaciğer homojenatlarında ve kanda metabolizma enzimlerindeki değişim incelenmiştir. Uygulanan flumetrinin karaciğer ağırlığında ve mikrozomal protein içeriğinde değişim göstermemiş ancak, sitokrom p450 (%36,26), NADPH-sitokrom c redüktaz (% 38,48), anilin hidroksilaz (%52,87), aminopirin N-demetilaz (%54,17) ve UDP-glukuronoziltransferaz (%33,68) üretiminde anlamlı artışa neden olmuştur. Ayrıca antipirin kinetiğinde anlamlı değişimlere neden olmuştur. Antipirinin plazmada eliminasyonunu yavaşlatmıştır. Sonuç olarak, flumetrin maruziyetinin hepatik enzim seviyelerini ve antipirinin oksidatif metabolizmasında olduğu gibi monooksijenaz sistemin katalitik aktivitelerini azalttığı belirlenmiştir (Anadon ve diğ., 1995). Misha ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada, 20 yetişkin Wistar albino sıçana 15 gün boyunca oral yolla verilen 5 mg/kg flumetrinin karaciğer enzimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, karaciğer homojenatlarında MDA, ALT, AST seviyelerinde artış görülürken, katalaz, SOD ve protein seviyelerinde azalma görülmüştür. Bu sonuçlar, flumetrinin hepatotoksik etkili olduğu ve vücuttaki oksidatif stres üretimini arttırdığı göstermiştir. (Mishra ve diğ., 2012b).

Küçük Kurt ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada; flumetrinin dökme çözeltisinin 0,2ml/kg dozunda sakız koyunlarının sırt derisi üzerine yedi gün boyunca uygulanması sonrasında oksidatif stres parametrelerindeki değişimlere etkisi C vitamini uygulaması ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Deney süresi sonunda, flumetrinin malondialdehit seviyesini değiştirmezken, kanda redükte glutatyon (GSH) konsantrasyonunu azaltmış, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerinde artışa neden olmuştur. C vitamini ile birlikte

uygulamanın ise oksidan/antioksidan dengeye olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir (Yurdakok-Dikmen ve diğ., 2017).

Flumetrinin *in vitro* etkilerinin değerlendirildiği Yurdakök ve diğ., 2017’de yaptıkları çalışmada, teke ve köpek spermaları üzerine flumetrinin sitotoksik etkileri MTT ve Nötral Red yöntemleri ile araştırılmıştır. Flumetrinin teke ve köpek spermaları üzerine dört saat boyunca uygulanması sonrasında MTT yöntemi ile belirlenen IC50 değerleri sırasıyla 67,89 ve 114,47 µg/ml olarak bulunmuştur. Nötral red yöntemi ile ise IC50 değeri hesaplanamamıştır (Yurdakok-Dikmen ve diğ., 2017). Flumetrinle aynı grup içerisinde yer alan diğer piretroidlerin *in vitro* olarak hücre kültürlerinde yapılan çalışmaları değerlendirildiğinde Gupta ve diğ., 2013 yaptığı çalışmada, alletrinin insan kornea epitel (HCE) hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiş, 24 saat süre ile 50 ve 100 µM alletrin uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma belirlenmiştir. 24 saat için hesaplanan IC50 değeri 85 µM olarak bulunmuştur (Gupta ve diğ., 2013). Alletrinin Sıçan testiküler karsinoma hücreleri olan LC540 hücre soyu ve Leydig hücresi primer hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkisinin değerlendirildiği çalışmada, MTT testi ile her iki hücre içinde doza bağlı olarak sitotoksitesinde artış gözlenmiş, IC50 değerleri sırasıyla 125 µM ve 59µM olarak bulunmuştur (Madhubabu ve Yenugu, 2014).

Piretroidlerden permetrinin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, insan lenfosit hücreleri 10, 25, 50 ve 100 µg/ml permetrin ve nanopermetrin ile 24 saat süre ile muamele edilmiş ve sonuçlar MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. 50 ve 100 µg/ml permetrin ve nanopermetrin uygulanan gruplarda kontrole göre hücre canlılığında anlamlı azalma görülmüştür (Sundaramoorthy ve diğ., 2016). Cypermetrinin sitotoksitesinin değerlendirildiği çalışmada, Çin Hamster Ovaryum hücrelerine 10, 100, 1000 ve 10000 µM dozlarda üç saat süre ile cypermetrin uygulanması sonucu 1000 µM dozu hücre canlılığını %88’e düşürürken, 10000 µM dozunda %58’e düşmüştür (Patel ve diğ., 2007). Cypermetrinin makrofaj hücreleri üzerine etkileri değerlendirilmiş, en yüksek doz grubu olan 200 µM dozunda anlamlı azalma görülmemişken, 48 saat uygulama sonrasında 100 ve 200 µM dozunda anlamlı azalma gözlenmiştir (sırasıyla %83 ve %77), 12.5 ve 50 µM dozlarında ise anlamlı azalma gözlenmemiştir (Huang ve diğ., 2016). Cypermetrinin oksidatif stres ve sitotoksitesisi üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, insan nöroblastoma hücreleri olan SH-SY5Y hücrelerine uygulanan alfa cypermetrinin 0,01- 0,1- 1- 3- 10- 30- 60- 100 ve 1000µM dozları

24 saat süre ile MTT testi araştırılmıştır. MTT sonuçlarına göre alfa cypermetrinin, 60 μM üzerinde anlamlı azalma gözlenmiştir, IC_{50} değeri ise 78,3 olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında alfa cypermetrinin 60 μM üzerinde sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Romero ve diğ., 2017).

Yapılan bu çalışmada, flumetrinin daha önce *in vitro* olarak hücre canlılığına etkisi belirlenmediğinden dolayı MCF-7 hücrelerinde IC_{50} dozunu hesaplayabilmek için 0,1, 1, 10, 100, 200, 500, 1000 ve 2000 μM olarak sekiz farklı dozu uygulanmıştır. MCF-7 hücrelerinde 24 saat flumetrin uygulaması ile 100 μM dozunun üzerinde hücre canlılığının azalması Gupta ve diğ. (2013) ve Madhubabu ve Yenugu (2014)'nın alletrin ile yaptıkları, Romero ve diğ. (2017) yılında cypermetrin ve Sundaramoorthy ve diğ. (2016) yılında permetrin ile yaptıkları çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde bulunmuştur. 48 saat flumetrin uygulandığında 200 μM dozunun üzerinde hücre canlılığında görülen anlamlı azalma, Huang ve diğ. (2016) cypermetrin ile yaptıkları çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde bulunmuştur. Flumetrin için hesaplanan IC_{50} değeri diğer piretroidlerin sonuçları ile karşılaştırıldığında; flumetrinin MCF-7 hücrelerinde 1670 μM bulunmuşken, Romero ve diğ. (2017) SH-SY5Y hücrelerinde cypermetrin için 78.3 μM , Gupta ve diğ. (2013) HCE hücrelerinde 85 μM ve Madhubabu ve Yenugu (2014) LC540 hücrelerinde 125 μM , primer Leydig hücrelerinde 59 μM olarak gösterilmiştir. Bu durum flumetrinin, permetrin, cypermetrin ve alletrine göre hücre canlılığı üzerine daha az toksik etkisi olabileceğini göstermektedir.

Tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan LDH enzimi hücre zarının hasarlandığı durumlarda ekstraselüler alana çıkmaktadır, hücre kültüründe kültür medyumunda bulunan LDH enzim miktarı hasarlanan hücre zarı hakkında bilgi vermekte ve sitotoksiteyi göstermektedir (Romero ve diğ., 2017). Cypermetrinin 2017 yılında yaptıkları çalışmada, insan nöroblastoma hücreleri olan SH-SY5Y hücrelerine uygulanan alfa cypermetrinin 0,01- 1000 μM dozları 24 saat süre ile LDH testi sonuçlarında ise, benzer şekilde 60 μM üzeri dozlarda anlamlı artış ve IC_{50} dozu 71,5 μM olarak belirlenmiştir (Romero ve diğ., 2017). Tip II piretroidlerden altı tanesinin (λ -cyhalotrin, α -cypermetrin, deltametrin, cyfenotrin, cyflutrin ve esfenvalerate), SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri, HepG2 hepatoma hücreleri ve CaCo-2 intestinal epitel hücreleri üzerine toksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada LDH testleri yapılmıştır. 24 saat uygulama sonrasında, 1-1000 μM arasındaki dozlarda her bir piretroid için tüm hücre soylarında doza bağlı olarak kontrole göre hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. LDH testi

sonrasında bulunan sonuçlar değerlendirildiğinde, LDH salınımında benzer şekilde doza bağlı artış gözlenmiştir. ED50 (hücre canlılığını %50'ye düşürmek için kullanılan etkili doz) değerleri, sırasıyla SH-SY5Y hücre soyu için 9,1- 106,4- 5,6- 7,2- 16,8 ve 16,9 olarak; HepG2 hücre soyu için 10,6- 83,3- 81,9- 24,5- 35,2 ve 5 olarak; Caco-2 hücre soyu için 19,0- 28,1- 6,3- 4,1- 2,9 ve 1,4 olarak bulunmuştur (Romero ve diğ., 2015). 2009 yılında sıçan feokromositoma hücreleri olan PC12 hücreleri üzerinde Bifentrinin enantiomerlerinin sitotoksitesinin araştırıldığı çalışmada, 1S-cis-Bifenthrin, 1R-cis-Bifenthrin ve rasemik karışım bifenthrin 24 saat süre uygulanmıştır. Alamar mavisi testi sonuçlarına göre 10^{-9} ve 10^{-6} arasında hücre canlılığında %20 oranında düşüş görülmezken, ancak 10^{-5} dozunun üzerinde 1S-cis-bifenthrinde görülen düşüş diğerlerinden anlamlı olarak daha fazla olmuştur (5×10^{-5} dozunda %55 e varan düşüş). LDH testi sonuçları değerlendirildiğinde, benzer şekilde 1S-cis-bifenthrinde 10^{-6} dozunun üzerinde LDH salınımında anlamlı artış görülmüş ve bu artışın R enantiomeri ve rasemik karışımından daha fazla olduğu görülmüştür (Lu ve diğ. 2009).

Yapılan bu çalışmada, LDH testi ile flumetrin 24 saat sonunda 1000 μ M dozu ve üzerinde LDH aktivitesinde anlamlı artış göstermektedir, bu sonuçlar MTT testi sonuçlarımız ile uyumlu olmakla birlikte flumetrinin diğer piretroidlerden daha yüksek dozlarda toksik etki gösterdiği bulunmuştur. Bu durumun hücre canlılığındaki sonuçlara benzer şekilde flumetrinin düşük dozlarda daha az toksik etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Apoptoz, çeşitli ekstrinsik ve intrinsik sinyallerle başlatılabilmektedir. Bunlar ROS (reaktif oksijen türleri), RNS (reaktif nitrojen türleri) ya da DNA'ya zarar veren ajanlar (örneğin radyasyon), ısı şoku, serum deprivasyonu, viral enfeksiyon gibi stresler olabileceği gibi pestisitler, çevresel kirlenimler ve kemoterapötik ilaçlar gibi ksenobiyotiklere maruz kalmakla da apoptoz tetiklenebilmektedir (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates, 2016). Apoptozun moleküler mekanizmasında anahtar rol oynayan düzenleyiciler bcl-2 ailesi proteinleridir. Bu aile üyelerinden Bax ve Bak proapoptotik, Bcl-2 ve Bcl-x_L antiapoptotik olarak görev yapmaktadırlar (Sharifi ve diğ., 2015). p53 proteini ise Bax ve Bcl-2 genlerinin en bilinen regülatörlerindendir (Kim ve diğ., 2008). Ayrıca, p21 proteini ise, hücre siklusunun G1 fazındaki durdurulmasını indükleyen p53'ün temel düzenleyicisidir (Jiang ve diğ., 2014).

Cypermethrin ve Cyfluthrinin apoptotik etkilerinin AO/EtBr tekniği ile değerlendirildiği çalışmada, insan periferik kan lenfositleri 1- 2- 3,75- 7,5- 15 ve 30 μ g/ml cyhalotrin ve

cypermetrine 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonucunda, 15 ve 30 µg/ml Cyflutrin dozlarında apoptoz anlamlı artmıştır. Cypermetrinin ise 3,75- 7,5- 15 ve 30 µg/ml dozlarında apoptoz anlamlı şekilde artmıştır (Muranli, 2013). Alletrinin insan kornea epitel hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süreleri ile 85 µM alletrine maruz bırakılan hücrelerdeki Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, alletrinin bax ekspresyonunu arttırırken, bcl-2 ekspresyonunu azalttığı ve bundan dolayı klasik yolla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Gupta ve diğ., 2013). Alletrinin sıçan testiküler karsinoma hücreleri olan LC540 hücre soyu ve Leydig hücresi primer hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, öncelikle morfolojik olarak doza bağlı olarak apoptotik bodylerin artışı gözlenmiştir. Flow sitometre cihazı ile annexin-V boyaması sonucu erken apoptoz, apoptoz ve nekroz oranları belirlenmiş, alletrin uygulanması ile erken apoptoz verileri anlamlı şekilde artmıştır. Geç apoptoz ile verilerde artış olmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. RT-PCR ile yapılan apoptoz belirteçlerine göre, LC540 hücrelerinde, p53 seviyesi altı saat üzerindeki alletrin maruziyetlerinde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bcl-2, prokaspaz-3 ve PARP-1 mRNA seviyelerinde ise anlamlı azalma gözlenmiştir (Madhubabu ve Yenugu, 2014).

Cypermetrinin makrofaj hücreleri üzerine yaptığı çalışmada, apoptoza etkisini değerlendirmek için Hoechst 33342 ile boyama yapılmıştır. Sonuçta 100 ve 200 µM cypermetrin uygulanan grupta kontrole göre daha fazla apoptotik yapılar (nüklear parçalanma, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimler) olduğu belirlenmiştir. P53 ve p21 seviyeleri western blot tekniği ile araştırılmıştır. P53 geninin upregüle olduğu, bu durumun p21'i arttırdığı gösterilmiştir (Huang ve diğ., 2016). Romero ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları α-cypermetrinin sitotoksik etkisinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, apoptoz ve nekroz ile ilişkili genlerden kontrole göre bcl-2 geninin 3,62 kat farkla up-regüle olduğu belirlenmiştir (Romero ve diğ., 2017). Lu ve diğ., 2009 yılında yaptıkları çalışmada, bifenthrinin enantiomerlerinin PC12 hücrelerinde apoptotik etkisi değerlendirilmiş ve Hoechst 33342 boyası ile boyanma sonrası bulunan sonuçlara göre, cis-bifenthrin ve enantiomerlerinin 10⁻⁵ M dozunda apoptozu anlamlı şekilde arttırdığı, 1-S-cis bifenthrinin ise 2.5 kat daha fazla arttırdığı görülmüştür (Lu ve diğ., 2011).

Bu tez çalışmasında, flumetrinin erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları belirlenmiş 100 µM ve 1000 µM dozlarında geç apoptozda anlamlı artış gözlenmiştir. Ayrıca, apoptoz

yolağında yer alan anti-apoptotik rol üstelenen bcl-2 geninin mRNA ekspresyonunda azalma görülürken, apoptotik mekanizmada görevli bax geninin mRNA ekspresyonunda artış görülmesi apoptozun mitokondriyal intrinsik yolak üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, p53 ve p21 mRNA ekspresyonunda görülen artış hücre siklusunun G0/G1 fazında durdurulup hücrenin apoptozu başlatmasında rol oynadıkları görülmüştür. Elde edilen verilerle flumetrinin alletrinin ve cypermetrin ile yapılan çalışmalarda sonuçlara benzer şekilde apoptozu yol açtığı ve apoptoz yolağında yer alan aynı genleri aktive ettiğini göstermektedir (Gupta ve diğ., 2013; Huang ve diğ., 2016; Romero ve diğ., 2017; Madhubabu ve Yenugu 2014).

Pestisitler, östrojen ve testosteron gibi hormonların reseptörlerine bağlanması sonucu agonist ya da antagonist etki oluşturarak, steroidogenik yollar üzerine etki oluşturarak ve üreme hücrelerinde apoptotik etki oluşturarak endokrin bozucu etki göstermektedir (Mnif ve diğ., 2011). Pestisitlerin östrojenik, antiöstrojenik, antiandrojenik ve antiprogostatik etkileri ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Sun ve diğ., 2007; Xu ve diğ., 2008; Xu ve diğ., 2006; Zhang ve diğ., 2008, Zhao ve diğ., 2008; Tange ve diğ., 2014; Go ve diğ., 1999; Du ve diğ., 2010; Brander ve diğ., 2012; Wielogorska ve diğ., 2015; Chen ve diğ., 2002; Jin ve diğ., 2010; Laffin ve diğ., 2010; Saillenfait ve diğ., 2016; Kim ve diğ., 2015; Garey ve Wolff, 1998).

Çevresel kimyasallarda görülen östrojenik etkinin belirlenmesi için östrojene spesifik etkilere sahip birçok sistemde çalışılmaktadır. Östrojenik etki; *in vivo* olarak uterusun ağırlığında ve enzim aktivitesinde artış, erkek balıklardaki dişiye özgü yolk proteini olan vitellojenin üretiminde artışta görülebildiği gibi, *in vitro* olarak insan kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunda ve östrojen bağımlı genlerin transkripsiyonunda artış ile belirlenebilmektedir. Ayrıca birçok kimyasalın östrojenik aktivitesinin östrojen reseptörü (ER) ile ilişkili olduğu, bundan dolayı hormon reseptör aktivitesini ölçen analizlerin, östrojenik etki hakkında bilgi sağlayacağını bilinmektedir (Chen ve diğ., 2002).

MCF-7 insan meme kanseri hücre soyu gibi östrojen reseptörü eksprese eden hücrelerde östrojen aktivitesini ölçmek için kullanılan yollardan biri E-screen olarak isimlendirilen ve östrojenin hücre proliferasyonunun hızını arttırmasına dayanan bir yöntemdir. Aynı zamanda

MCF-7 hücrelerinde östrojenle ekspresyonu arttığı bilinen pS2, progesteron ve ER mRNA ekspresyon seviyeleri de belirlenebilmektedir (Soto ve diğ., 1995; Chen ve diğ., 2002).

Go ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmada, dtrans-alletrin, fenvalerat, sumitrin ve permetrinin MCF-7 hücrelerinde E-screen yöntemi ve pS2 mRNA miktarına göre östrojenik ve antiöstrojenik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, MCF- hücrelerinde proliferatif etki açısından, fenvaleratın 10 ve 100 μ M dozunda, d-trans allethrinin 10 μ M dozunda, permetrinin 100 μ M dozunda anlamlı artış görülürken, sumitrinin 10 μ M dozunda artış olmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. Ps2 mRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde, sumitrinin 10 ve 100 μ M dozunda, fenvaleratın 10 μ M dozunda ve permetrinin 100 μ M dozunda en yüksek artışlar saptanmışken, d-trans allethrin ps2 ekspresyonunu arttırmamıştır. Sonuçta, nanomolar konsantrasyonlarda sumitrin ve fenvalerate ps2 ekspresyonunu bazal seviyeye göre arttırmış; mikromolar seviyede ise, pozitif kontrolle karşılaştırılabilir düzeyde bulunmuştur. Ayrıca, fenvalerate ve sumitrin doza bağlı olarak MCF-7 proliferasyonunu indüklerken, permetrin 100 μ M dozunda proliferasyonu etkilemiş ve alletrin ise 10 μ M dozunda düşük miktarda etki göstermiştir. (Go ve diğ., 1999). Chen ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada, permetrin, fenvalerat, cypermetrin ve deltametrinin östrojenik etkileri E-screen ve ps2 ekspresyonu yöntemi ile araştırılmış ve bu piretroidlerin MCF-7 hücre proliferasyonunu anlamlı derecede arttırdığı, fenvalerat permetrin ve cypermetrinin ps2 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiş, deltametrinde ise anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Bulunan proliferatif etki (PE) değerleri; östrojen: 3,46; fenvalerat: 2,17; cypermetrin: 1,46; deltametrin: 1,74 ve permetrin: 2,69 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre hesaplanan göreceli proliferatif etki (RPE) açısından bu piretroidlerin östrojene parsiyel agonist aktivite gösterdikleri belirtilmiştir. Ps2 mRNA ekspresyonunu fenvalerat 10^{-6} μ M dozunda 1,67 kat, permetrin 10^{-7} μ M dozunda 1,28 kat ve cypermetrin 10^{-6} μ M dozunda 2,01 kat arttırmıştır (Chen ve diğ., 2002).

Jin ve arkadaşları 2010 yılında permetrin, β -cypermetrin ve metabolitleri olan 3-fenoksibenzoik alkol (PBCOH), 3-fenoksibenzaldehit (PBCHO) ve 3-fenoksibenzoik asitin (PBCOOH) E-screen ve ps2, ER α mRNA ekspresyonu yöntemi ile östrojenik aktivitesi değerlendirilmiştir. Permetrin ve cypermetrinin 10^{-7} M dozu, östrojen ile karşılaştırıldığında göreceli proliferatif etki oranları sırasıyla %55,4 ve %56,3 bulunduğundan anlamlı östrojenik etki göstermiştir. RT-PCR sonuçları açısından, permetrinin ve cypermetrinin 10^{-6} M dozunda

ps2 ve ER α mRNA seviyelerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Üç temel metabolitten PBCOH ve PBCOOH grupları östrojenik etkili bulunurken, PBCHO grubunda anlamlı değişiklik gözlenmemiştir (Jin ve diğ., 2010).

Piretroid insektisitlerin ve metabolitlerinin reporter gen tayini ile hormon reseptör aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmada, cycloprotrin, cyflutrin, cyhalotrin, fenvalerate, cypermethrin, permethrin, deltamethrin, tetramethrin, dimetilsikloprospan (DCCA) ve 3-fenoksibenzoik asitin reporter gen tayini ile östrojen reseptörü (ER), androjen reseptörü (AR) ve tiroid hormon reseptörü (TR) aktiviteleri belirlenmiştir. Östrojenik aktiviteleri cyhalothrin > permethrin > fenvalerate > deltamethrin, antiöstrojenik aktiviteleri DCCA, cycloprothrin, etofenprox, 3-PBA, cyfluthrin, permethrin ve antiandrojenik aktiviteleri deltamethrin > cyfluthrin > fenvalerate > cyhalothrin > cypermethrin > permethrin > 3-fenoksibenzoik asit olacak şekilde belirtilmiştir (Du ve diğ., 2010). Laffin ve diğerleri, 2010 yılında yaptıkları çalışmada, piretroid metabolitlerinin östrojenik aktivitesini E-screen ve reporter gen ile araştırmışlardır. 3-fenoksibenzoik aldehitin EC50 değeri $6,67 \times 10^{-6}$ M dozu olmak üzere östrojenik etkili ve 3-fenoksibenzoik asitin IC50 değeri 6.5×10^{-5} dozu olmak üzere anti-östrojenik etki gösterdiği belirtilmiştir (Laffin ve diğ., 2010).

Lambda-cyhalotrinin östrojenik etkisinin değerlendirildiği çalışmada, MCF-7 hücrelerinde E-screen testinde 10^{-7} M dozu anlamlı artışa neden olmakta ve RPE oranı %45 olarak gösterilmektedir. RT-PCR ile ps2 ve PGR mRNA ekspresyonları değerlendirildiğinde, 10^{-7} M lambda-cyhalotrinin 2 ve 1,5 kat artışla up-regule oldukları belirlenmiştir. ER α ve ER β protein ve mRNA ekspresyonları 17 β -östrodiol ile benzer şekilde bulunmuştur (Zhao ve diğ., 2008). Tange ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada, permethrinin cis ve trans izomerlerinin östrojenik ve anti-androjenik aktiviteleri reporter gen yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, trans-permethrin anti-androjenik ve düşük östrojenik aktivite gösterirken, cis-permethrin düşük östrojenik ve düşük anti-androjenik aktivite göstermiştir (Tange ve diğ., 2014).

Flumetrinin de içinde bulunduğu 59 endokrin bozucu maddenin araştırıldığı *in vitro* alışmada, reporter gen yöntemi ile östrojenik etkiler değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda

flumetrinin düşük ER agonisti olduğu EC₅₀ değeri 2.4×10^{-4} M olarak, göreceli etki değeri de 6.9×10^{-8} M olarak bulunmuştur (Wielogorska ve diğ., 2015).

Flumetrinin östrojenik etkilerini değerlendirdiğimizde E-screen yöntemi ile 1 ve 0,1 µM dozunda proliferatif etki 1,138 ve 1,44, RPE oranı ise %77 ve %80 olarak bulunmuştur. Ayrıca RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde flumetrinin 0,1 µM dozunda pS2, ERα ve PGR mRNA seviyelerinde östrojene benzer şekilde kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Elde edilen bulgular östrojenik etkisi incelenmiş piretroidlerin sonuçları ile paralellik göstermektedir (Zhao ve diğ., 2008; Jin ve diğ., 2010; Chen ve diğ., 2002). Bu çalışma ile flumetrinin östrojenik özellikleri belirlenmiş olup diğer östrojenik etkili piretroidlerde olduğu gibi etkisini östrojene benzer mekanizma ile ERα üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

Pestisitlerin genotoksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle değerlendirilen birçok çalışmada gösterilmiştir (Vardavas ve diğ., 2016; Patel ve diğ., 2007; Sundaramoorthy ve diğ., 2016; Suman ve diğ., 2006; Srivastava ve diğ., 2012). DNA kimyasallara karşı oldukça hassas olduğundan dolayı ksenobiyotiklerin DNA hasarına etkisinin değerlendirilmesi önemlidir. En sık kullanılan yöntem olan mikronükleus testi ile kimyasal maddenin hem klastojenik hemde anojenik potansiyeli değerlendirilebilmektedir (Vardavas ve diğ., 2016).

Lambda- Cyhalotrinin genotoksik etkisi mikronükleus testi *Rana catesbeiana* türünün iribaş yavrularında kan smear örneklerinde değerlendirildiği çalışmada, 0,02- 0,1- 0,2 ve 0,4µg/ml dozlarında 24, 48, 72 ve 96 saat ve 8, 15, 20 ve 30 gün sonrasında incelenmiştir. Uygulanan en yüksek doz için 24, 48 ve 72 saat sonrasında eritrositlerde mikronükleus sıklığı anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca 20 gün sonunda da anlamlı artış olmakla beraber iribaşlar 20 günden fazla yaşamamışlardır (Campana ve diğ., 2003). Tip 2 piretroid grubuna ait olan cypermetrin ve onun etkisini arttırıcı özelliğe sahip olan piperonil butoksitin Yeni Zelanda beyaz tavşanlarındaki genotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, 4 ay süre ile birlikte ve ayrı ayrı verilen pestisitlerin etkileri lenfositlerinde mikronükleus testi yapılarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, doza ve süreye bağlı olarak mikronükleus oluşumunu arttırdıkları ancak kombinasyonun etkiyi anlamlı şekilde arttırmadığı gösterilmiştir (Vardavas ve diğ., 2016). Tip 1 piretroidlerden biri olan alletrinin Swiss albino fareler üzerindeki genotoksik etkileri kemik iliği hücrelerinde mikronükleus yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yedi gün boyunca 25 ve 50 mg/kg/vücut ağırlığı olarak uygulanan alletrin mikronükleus oluşumunda

kontrole göre anlamlı artış göstermiştir ($5,0 \pm 0,47$; $11,60 \pm 0,72$; $18,0 \pm 0,47$) (Srivastava ve diğ., 2012).

Ila ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada, cyflutrinin genotoksik potansiyelini belirlemek amacıyla, sağlıklı donörlerden alınan insan lenfosit hücrelerine 500, 1000 ve 2000 μM dozlarında 24 ve 48 saat uygulanan cyflutrinin mikronükleus oluşumuna etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, 24 saatte 1000 μM ve üzeri dozlarda mikronükleus oluşumunda artış görülürken, 48 saatte tüm dozlarda kontrole göre mikronükleus anlamlı şekilde artmıştır (Ila ve diğ., 2008). Permetrinin genotoksitesinin araştırıldığı çalışmada, permetrin ve nanopermetrin insan lenfositlerine 24 saat süre ile 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında uygulama sonrasında mikronükleus oluşumu ve nüklear abnormaliteler belirlenmiştir. Her iki permetrin formunda da doz artışına bağlı olarak mikronükleus, nüklear bud ve köprü oluşumunda kontrole göre anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (Sundaramoorthy ve diğ., 2016). α - Cypermetrin ve lambda- Cyflutrinin genotoksik etkilerinin mikronükleus tekniği ile değerlendirildiği çalışmada, insan periferik kan lenfositleri 1- 2- 3,75- 7,5- 15 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ cyhalotrin ve cypermetrine 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakılmıştır. 24 ve 48 saat cyflutrin maruziyeti sonrasında yalnızca 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında MN sayılabilmemiş ve anlamlı sonuç bulunamamıştır. Diğer dozlarda sitotoksik etki görülmüştür. Cypermetrinin 24 ve 48 saat uygulanmasının sonucunda 30 $\mu\text{g/ml}$ dozu hariç MN hesaplanmış tüm dozlarda kontrole göre artış olmasına rağmen sonuçlar anlamlı bulunmamıştır (Muranli, 2013).

Flumetrinin *in vivo* olarak genotoksik etkilerinin gösterildiği çalışmada, erkek albino Webster türü farelerde tek doz dermal (5,325 mg/kg vücut ağırlığı) yanı sıra tek (0,694/ 1,389/ 2,083 mg/kg/vücut ağırlığı) ve çoklu doz (4 gün süre ile 50,80, ve 128 mg/kg vücut ağırlığı) intraperitoneal olarak flumetrin uygulanması sonrasında kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks, kromozom aberasyonu ve mikronükleus oluşumu incelenmiştir. Flumetrin, polikromatik eritrosit seviyesinde ve mitotik indeksteki düşmeden dolayı hem eritropoiezde hemde miyelopoiezde sitotoksik etki göstermiştir. Kromozomal aberasyonlardan gap oluşumunda dermal maruziyet sonrasında artış olurken, intraperitoneal uygulamada yalnızca en yüksek dozun sonrasında kromozomal kırıklarda artış gözlenmiştir. İntraperitoneal yolla tekli ve çoklu flumetrinin uygulamalarının sonrasında polikromatik eritrositlerdeki mikronükleus oluşumunda anlamlı artış gözlenmiştir (Nakano ve diğ., 1996).

Bu çalışmada, flumetrinin genotoksik etkilerinin değerlendirildiği mikronükleus testi sonuçlarına göre, uygulanan 1, 10, 100 ve 1000 μM dozlarında doza bağlı olarak mikronükleus oluşumunda anlamlı artış gözlenmiş ve kromozomal abnormaliteler 10 ve 100 μM dozlarının üzerinde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu sonuçlar insan lenfosit hücrelerinde permetrin ve cyflutrin ile yapılan (Sundaramoorthy ve diğ., 2016; İla ve diğ., 2008) çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Genotoksisitenin belirlenmesi için kullanılan diğer bir yöntem olan Komet yöntemi, ökaryotik hücrelerde oluşan DNA hasarının ölçülmesini hızlı ve kantitatif bir şekilde sağlamaktadır. Bu yöntem DNA'da hasara neden olan ajanlara cevap olarak birçok hücre türünde oluşan DNA hasarının ya da onarımının araştırılmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Liao ve diğ., 2009).

Deltametrinin genotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, dört hafta boyunca deltametrin ve biyopestisite maruz bırakılan sıçanların kemik iliği hücrelerinde Komet analizi yapılmıştır. Sonuç olarak, deltametrin uygulanan deney grubunda kuyruk DNA %'si kontrole göre anlamlı şekilde artmış biyopestisit uygulanan grupta ise deltametrine göre azalma görülmüştür (İsmail ve Mohamed, 2012).

Zeta-Cypermethrin ve β -cyflutrin'nin genotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, insan periferel kan lenfosit hücrelerine 6,12, 18, 24 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ cypermethrin ve 6,3, 12,5, 18,8, 25 ve 31,3 $\mu\text{g/ml}$ β -cyflutrin 24 saat süre ile uygulanmıştır. Komet testinin sonuçlarına göre; cypermethrinin 6 $\mu\text{g/ml}$ dozu hariç tüm dozlarda kuyruk uzunluğu, kuyruk moment ve kuyruk yoğunluğu genotoksik parametreleri için anlamlı artış gözlenmiştir. 6 $\mu\text{g/ml}$ dozu için yalnızca kuyruk yoğunluğu parametresi kontrole göre anlamlı çıkmıştır. β -cyflutrin'nin tüm dozlarında, tüm genotoksik parametrelerde kontrol göre anlamlı artış gözlenmiştir (Calderón-Segura ve diğ., 2018). Cypermethrinin sitogenetik etkilerinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, insan lenfosit hücrelerinde Komet analizi yapılmış ve kuyruk uzunlukları değerlendirilmiştir. İki saat süre ile cypermethrinin 3,36; 3,60 ve 3,84 dozlarına maruz bırakılan lenfositlerde Komet kuyruk uzunlukları doza bağlı olarak artış gözlenmiştir (Suman ve diğ., 2006). Cypermethrinin genotoksik etkilerinin de değerlendirildiği Patel ve diğ. (2007) yılında yaptıkları çalışmada, Üç saat süre ile 1, 10, 100, 1000 ve 5000 μM cypermethrin, pendimethalin ve dichlorfosa maruz bırakılan CHO hücreleri Komet testi ile değerlendirilmiş.

Sonuçta, olive kuyruk momenti, kuyruk DNA %'si ve kuyruk uzunluğu değerlerinde 1000 ve 5000 μM dozlarında kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır (Patel ve diğ., 2007).

Bu çalışma ile flumetrinin genotoksik etkileri Komet yöntemi ile de araştırılmıştır. Olive kuyruk momenti, kuyruk momenti, kuyruk DNA %'si ve kuyruk uzunluğu parametreleri değerlendirilmiş olup, kuyruk DNA %'si hariç tüm parametrelerde 10 μM ve üzerindeki dozlarda, kuyruk DNA %'sinde 100 μM ve üzeri dozlarda kontrole göre anlamlı artış gözlenmiştir. Flumetrinin genotoksitesisi ile ilgili elde edilen sonuçlar diğer piretroidlerle yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Suman ve diğ., 2006; Patel ve diğ., 2007).

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında flumetrinin sitotoksik, apoptotik, östrojenik ve genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Flumetrinin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin gösterildiği testlerde 1000 μM ve üzeri dozlarda anlamlı sonuçlar elde edilmiş ancak genotoksitesite testleri ile 1 μM üzerinde anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Bundan dolayı flumetrinin toksik etkilerinin, sitotoksitesite yönünden daha yüksek dozlarda görülmekle beraber genotoksik etkisinin düşük dozlarda da ortaya çıkabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda 0,1 μM dozunda östrojenik etkisinin görülmesi flumetrinin çok düşük dozlarda alımında dahi endokrin bozucu etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Daha sonra yapılacak araştırmalarda, flumetrinin toksisitesi ve östrojenik aktivitesiyle ilgili mekanizmalar daha detaylı olarak ve enantiomerleri ile ilişkili olarak incelemeli, katkıda bulunan metabolitlerinin rolü araştırılmalı ayrıca başka hücre soyları üzerindeki etkileri gösterilmelidir. Flumetrinin ve diğer piretroidlerin yaygın kullanımları ve çevrede birçok yerde bulunmaları dikkate alındığında, çevre ve insan sağlığı riskinin azaltılması için daha kapsamlı çalışmalar ve epidemik araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar S., Rezaie, A., 2004, Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, 10 (6), 141-7.
- Akhtar, N., Kayani, S., Ahmad M., Shahab, M., 1996, Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in rats. *Journal of Applied Toxicology*, 16, 397-400.
- Al-Sarar, A.S., Abobakr, Y., Bayoumi A.E., Hussein H.I., 2015, Cytotoxic and genotoxic effects of abamectin, chlorfenapyr, and imidacloprid on CHOK1 cells. *Environ Sci Pollut Res Int*, 22, 17041-52.
- Almeida, C., Cardoso, M.F., Sousa, M., Viana, P., Goncalves, A., Silva J., Barros A., 2005, Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Hum Reprod*, 20, 1307-13.
- Altıkat A., Turan, T., Torun, F., Bingöl Z., 2009, Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak.Derg.* 40 (2), 87-92.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas, P., Fernandez, M.C., Martinez M.A., Fernandez-Cruz M.L., 1995, Effects of flumethrin on hepatic drug-metabolizing enzymes and antipyrine disposition in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 132, 14-8.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga M.R., Martinez M.A., 2009, Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet J*, 182, 7-20.
- 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. *Toxicol Appl Pharmacol*, 212, 156-66.
- Andersen, H. R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen I.M., Bonefeld-Jorgensen E.C., 2002, Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 179, 1-12.
- Andrade, A.J., Araujo, S., Santana, G.M., Ohi, M., Dalsenter, P.R., 2002a, Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 36, 310-7.
- Andrade A.J., Araújo, S., Santana G.M., Ohi, M., Dalsenter, P.R., 2002b, Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. *Regul Toxicol Pharmacol*, 35, 379-82.
- Arslan, N. ve Yilmaz, G., 1993, Pestisit kirliliğinin azaltılmasında bitkisel bir kaynak Pireotu (*Pyrethrum sp.*) türleri. *Çevre Dergisi*, 6, 3-6.

- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya N., Patel H.R., 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5, 209-219.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001, Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*, 16, 1-40.
- Basci, Z. and Eraslan, G., 2015, Toxicokinetic of flumethrin in rabbits. *Drug Chem Toxicol*, 38, 92-7.
- Baskic, D., Popovic, S., Ristic, P., Arsenijevic, N.N., 2006, Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*, 30, 924-32.
- Başçi, Z. and Eraslan, G., 2015, Toxicokinetic of flumethrin in rabbits. *Drug and Chemical Toxicology*, 38, 92-97.
- Bissacot, D.Z., Vassilieff, I., 1997, HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. *J Anal Toxicol*, 21, 397-402.
- Blomberg, M., 2017, *Veterinary antiparasitic pharmaceuticals—effects on behaviour in fish larvae*. Degree Project 30 credits within the Veterinary Medicine Programme. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health.
- Braganca, I., Lemos, P.C., Barros, P., Delerue-Matos, C., Domingues, V.F., 2018, Phytotoxicity of pyrethroid pesticides and its metabolite towards *Cucumis sativus*. *Sci Total Environ*, 619-620, 685-691.
- Brander, S. M., He, G., Smalling, K.L., Denison, M.S., Cherr, G.N., 2012, The *in vivo* estrogenic and *in vitro* anti-estrogenic activity of permethrin and bifenthrin. *Environ Toxicol Chem*, 31, 2848-55.
- Bretveld, R.W., Thomas, C.M., Scheepers, P.T., Zielhuis, G.A., Roeleveld, N., 2006, Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 30.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simo, E., Pico, Y., 2017, Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Sci Total Environ*, 605-606, 745-754.
- Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Cortés-Eslava, J., Martínez-Valenzuela, C., Mojica-Vázquez, L.H., Sosa-López, M., Flores-Ramírez, D., Romero-Velázquez, Z.E., 2018, *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of Furia® 180 SC (zeta-cypermethrin) and Bulldock 125® SC (β-cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology mechanisms and methods*, 28, 268-278.
- Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M.d.C., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, R., Flores-Ramírez, D., Rodríguez-Romero, M.I., 2012, Evaluation of genotoxic and

cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. *Journal of toxicology*, 2012:612647.

- Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 2003, Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 99-103.
- Carlsson, G., Blomberg, M., Pohl J., Orn S., 2018, Swimming activity in zebrafish larvae exposed to veterinary antiparasitic pharmaceuticals. *Environ Toxicol Pharmacol*, 63, 74-77.
- Chaufan, G., Galvano, C., Nieves, M., Mudry, M.D., Rios de Molina M.D.C., Andrioli N.B., 2019, Oxidative response and micronucleus centromere assay in HEP-2 cells exposed to fungicide Iprodione. *Chem Res Toxicol*. 15;32(4):745-752.
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao H., Wang X., 2002, Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health A*, 65, 1419-35.
- Costa, L.G., 2008, *Toxic Effects of Pesticides*. Casarett And Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons, In: Klaassen C.D. (ed.) Chapter 22, Mcgraw-Hill Medical Publishing Division, United States of America. 883- 930.
- Costa, L.G., 2017. *Pestisitlerin Toksik Etkileri*, Casarett & Doull's Toksikolojinin Temelleri, In: Klaassen C.D. and Watkins J.B. (ed.) Bölüm 22, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., Ankara.
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P., Williamson, M., 2007, DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59, 151-162.
- De, A., Bose, R., Kumar A., Mozumdar. S., 2014, Worldwide pesticide use. *Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles*, In: 5-6. Springer.
- De Paoli, M. and Barbina M.T., 1992, Solid-phase extraction and gas chromatographic determination flumethrin residues in honey. *Pesticide science*, 34, 61-63.
- Deeba, F., Raza, I., Muhammad, N., Rahman, H., Ur Rehman, Z., Azizullah, A., Khattak, B. Ullah, F., Daud, M.K., 2016, Chlorpyrifos and lambda cyhalothrin-induced oxidative stress in human erythrocytes: *In vitro* studies. *Toxicol Ind Health*. 33(4):297-307.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., 2005, Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*. 3-7 Ocak 2005, Ankara.
- Dereumeaux, C., Saoudi, A., Gorla, S., Wagner, V., De Crouy-Chanel, P., Pecheux, M., Berat, B., Zaros, C., Guldner, L., 2018, Urinary levels of pyrethroid pesticides and determinants in pregnant French women from the Elfe cohort. *Environ Int*, 119, 89-99.
- Djouaka, R., Soglo, M.F., Kusimo, M. O., Adeoti, R., Talom, A., Zeukeng, F., Paraiso, A., Afari-Sefa, V., Saethre, M.G., Manyong, V., Tamo, M., Waage J., Lines, J. Mahuku, G.,

- 2018, The Rapid Degradation of Lambda-Cyhalothrin Makes Treated Vegetables Relatively Safe for Consumption. *Int J Environ Res Public Health*, 15(7): 1536.
- Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang S., Wang X., 2010, Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol Sci*, 116, 58-66.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., Canhilal, R., 2010, Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği*, 7, 11-15.
- 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, 1-8.
- Elias, P., 2013, The Use of Deltamethrin on Farm Animals. In Insecticides-Development of Safer and More Effective Technologies. *InTech*.
- Elmore, S. 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- FAO, 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The State of Food and Agriculture 2002*. Rome, Italy.
- Faostat, F. 2016, Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2014). Production Available in: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> [Ziyaret tarihi: Mayıs 2018].
- Fenech, M., 1993, The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 285, 35-44.
- Fenech, M., 2000, The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res*, 455, 81-95.
- Fishel, F.M., 2013, Pest management and pesticides: A historical perspective. Publication PI219. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, USA Google Scholar.
- Garey, J., Wolff M.S., 1998, Estrogenic and antiprogestagenic activities of pyrethroid insecticides. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 855-9.
- Go, V., Garey, J., Wolff M.S., Pogo B.G., 1999, Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspect*, 107, 173-7.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R. Konradsen F., 2007, The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC public health*, 7, 357.
- Gupta, G., Chaitanya, R.K., Golla, M., Karnati R., 2013, Allethrin toxicity on human corneal epithelial cells involves mitochondrial pathway mediated apoptosis. *Toxicol In Vitro*, 27, 2242-8.

- Hansen, M.R.H., Jors, E., Lander, F., Condarco, G., Debes, F., Bustillos N.T., Schlunssen V., 2017, Neurological Deficits After Long-term Pyrethroid Exposure. *Environ Health Insights*, 11, 1178630217700628.
- Hayo, M.G., Werf v.d., 1996, Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, *Ecosystems and Environment*, 60, 81-96.
- Huang, F., Liu, Q., Xie, S., Xu, J., Huang, B., Wu Y., Xia D., 2016, Cypermethrin Induces Macrophages Death through Cell Cycle Arrest and Oxidative Stress-Mediated JNK/ERK Signaling Regulated Apoptosis. *Int J Mol Sci*, 17.
- Ichim, G. and Tait, S.W., 2016, A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16, 539.
- Ila, H.B., Topaktas, M., Rencuzogullari, E., Kayraldiz, A., Donbak, L., Daglioglu, Y.K., 2008, Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutat Res*, 656, 49-54.
- Ilboudo, S., Fouche, E., Rizzati, V., Toé, A.M., Gamet-Payrastre, L., Guissou, P.I., 2014, *In vitro* impact of five pesticides alone or in combination on human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology Reports*, 1, 474-489.
- Ismail, M.F. and Mohamed, H.M., 2012, Deltamethrin-induced genotoxicity and testicular injury in rats: comparison with biopesticide. *Food Chem Toxicol*, 50, 3421-5.
- Issam, C., Samir, H., Zohra, H., Monia, Z., Hassen, B.C., 2009, Toxic responses to deltamethrin (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *The Journal of toxicological sciences*, 34, 663-670.
- Jiang, Y., Zhang, M., Qian, Y., Xu, E., Zhang J., Chen X., 2014, Rbm24, an RNA-binding protein and a target of p53, regulates p21 expression via mRNA stability. *J Biol Chem*, 289, 3164-75.
- Jin, M., Li, L., Xu, C., Wen, Y., Zhao, M., 2010, Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites. *J Environ Sci (China)*, 22, 290-6.
- Kaneko, H. and Miyamoto. J., 2001, Pyrethroid Chemistry and Metabolism. *Handbook of Pesticide Toxicology: Principles and Agents* In: R. Krieger (ed.), 1263-1288. Academic press.
- Kaul, P., Rastogi, A., Hans, R., Seth, T., Seth P., Srimal, R., 1996, Fenvalerate-induced alterations in circulatory thyroid hormones and calcium stores in rat brain. *Toxicology letters*, 89, 29-33.
- Kerr, J. F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239.
- Kim, C.W., Go, R.E., Choi, K.C., 2015, Treatment of BG-1 Ovarian Cancer Cells Expressing Estrogen Receptors with Lambda-cyhalothrin and Cypermethrin Caused a Partial Estrogenicity Via an Estrogen Receptor-dependent Pathway. *Toxicol Res*, 31, 331-7.

- Kim, H., Chung, H., Kim, H.J., Lee, J.Y., Oh, M.Y., Kim Y., Kong, G. 2008, Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF-kappaB in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 112, 287-96.
- Kjeldsen, L.S., Ghisari, M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2013, Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272, 453-64.
- Klaassen, C. and Watkins III, J.B.. 2015. Casarett & Doull's essentials of toxicology. McGraw Hill Professional.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K., 2004, Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect*, 112, 524-31.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J., Hagenmaier, H., 1999, Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci Total Environ*. 12;225(1-2):33-48.
- Laffin, B., Chavez, M., Pine, M., 2010, The pyrethroid metabolites 3-phenoxybenzoic acid and 3-phenoxybenzyl alcohol do not exhibit estrogenic activity in the MCF-7 human breast carcinoma cell line or Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 267, 39-44.
- Lei, W., Wang, D.D., Dou, T.Y., Hou, J., Feng, L., Yin, H., Luo, Q., Sun, J., Ge, G.B., Yang, L., 2017, Assessment of the inhibitory effects of pyrethroids against human carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol*, 321, 48-56.
- Li, Z. and Jennings A., 2017, Worldwide regulations of standard values of pesticides for human health risk control: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 826.
- Liao, W., McNutt, M.A., Zhu, W.G., 2009, The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48, 46-53.
- Liu, J., Yang, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Liu, W., 2011, Disrupting effects of bifenthrin on ovulatory gene expression and prostaglandin synthesis in rat ovarian granulosa cells. *Toxicology*, 282, 47-55.
- Liu, K., Liu, P.-c., Liu, R., Wu, X., 2015, Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry. *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, 15.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Lu, X., Hu, F., Ma, Y., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, M., 2011, The role of oxidative stress in enantiomer-specific, bifenthrin-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Environ Toxicol*, 26, 271-8.

- Madhubabu, G. and Yenugu, S., 2014, Allethrin induces oxidative stress, apoptosis and calcium release in rat testicular carcinoma cells (LC540). *Toxicol In Vitro*, 28, 1386-95.
- Mailman, R.B., Chambers, J.E., Hodgson, E., Roe, R.M., 2015. *Dictionary of Toxicology*. Elsevier.
- Marettova, E., Mareta, M., Legath, J., 2017, Effect of pyrethroids on female genital system. Review. *Anim Reprod Sci*, 184, 132-138.
- Marinowic, D.R., Mergener, M., Pollo, T.A., Maluf, S.W., da Silva L.B., 2012, In vivo genotoxicity of the pyrethroid pesticide beta-cyfluthrin using the comet assay in the fish *Bryconamericus iheringii*. *Z Naturforsch C*, 67, 308-11.
- Mehrpour, O., Karrari, P., Zamani, N., Tsatsakis, A.M., Abdollahi, M., 2014, Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett*, 230, 146-56.
- Miao, J., Wang, D., Yan, J., Wang, Y., Teng, M., Zhou, Z., Zhu, W., 2017, Comparison of subacute effects of two types of pyrethroid insecticides using metabolomics methods. *Pesticide biochemistry and physiology*, 143, 161-167.
- Miranda-Contreras, L., Gomez-Perez, R., Rojas, G., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Colmenares, M., Barreto, S., Balza, A., Zavala, L. Morales, Y., Molina, Y., Valeri, L. Contreras, C.A., Osuna J. A., 2013, Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *J Occup Health*, 55, 195-203.
- Mishra, A., Dewangan, G., Mahajan V., Mandal T., 2012a, Effect of flumethrin on tissue biochemistry following oral administration in wistar albino rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 3, 191-200.
- Mishra, A., Dewangan, G., Mahajan, V., Mandal, T.K., 2012b, Effect of Flumethrin on Tissue Biochemistry Flowing Oral Administration in Wistar Albina Rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, 191-200.
- Mosmann T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16;65(1-2):55-63.
- Mnif, W., Hassine, A.I., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B., 2011, Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*, 8, 2265-303.
- Muranli, F.D.G., 2013, Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ -cyhalothrin and α -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90, 357-363.
- Nagy, K., Racz, G., Matsumoto, T., Adany, R., Adam, B., 2014, Evaluation of the genotoxicity of the pyrethroid insecticide phenothrin. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 770, 1-5.

- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S., Kitamura, S., 2007, The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*, 235, 176-184.
- Nakano, E., Rabello-Gay M. N. de Bragança Pereira C.A., 1996, Evaluation of the genotoxic potential of Flumethrin in mouse bone marrow by chromosomal analysis and micronucleus test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 16, 37-48.
- Nandhakumar, S., Parasuraman, S., Shanmugam, M.M., Rao, K.R., Chand, P., Bhat, B.V., 2011, Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J Pharmacol Pharmacother*, 2, 107-11.
- Orellana, E.A., Kasinski A.L., 2016, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*, 6 (21).
- Pajaniradje, S., Mohankumar, K., Pamidimukkala, R., Subramanian, S., Rajagopalan, R. 2014, Antiproliferative and apoptotic effects of Sesbania grandiflora leaves in human cancer cells. *Biomed Res Int*, 2014, 474953.
- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A., 2007, In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol In Vitro*, 21, 1409-18.
- Perugini, M., Tulini, S.M.R., Zezza, D., Fenucci, S., Conte, A., Amorena, M., 2018, Occurrence of agrochemical residues in beeswax samples collected in Italy during 2013-2015. *Sci Total Environ*, 625, 470-476.
- Pilane, M. C., Bagla, V.P., Mokgotho, M.P., Mbazima, V., Matsebatlela, T.M., Ncube, I., Mampuru L., 2015, Free Radical Scavenging Activity: Antiproliferative and Proteomics Analyses of the Differential Expression of Apoptotic Proteins in MCF-7 Cells Treated with Acetone Leaf Extract of Diospyros lycioides (Ebenaceae). *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 534808.
- Poapolathep, S., Tanhan, P. Piasai, O. Imsilp, K., Hajslova, J., Giorgi, M., Kumagai, S., Poapolathep A., 2017, Occurrence and Health Risk of Patulin and Pyrethroids in Fruit Juices Consumed in Bangkok, Thailand. *J Food Prot*, 1415-1421.
- Radovanović, T., Nasia, M. Krizmanić, I. Prokić, M. Gavrić, J. Despotović, S. Gavrilović, B. Borković-Mitić, S. Pavlović S. Saičić Z., 2017, Sublethal Effects of Pyrethroid Insecticide Deltamethrin on Oxidative Stress Parameters in Green Toad (Bufotes Viridis L.) *Environmental toxicology and chemistry*. 36(10):2814-2822.
- Rajini, A., Sathya, T.N. Parvathi, M.V.S., Dhandapani, P., 2015, Genotoxicity of the Synthetic Pyrethroid Insecticide Bifenthrin Technical in Zebra Fish Danio rerio Gill Tissue Assessed by the Alkaline Comet Assay. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, II, 62- 65.
- Redza-Dutordoir, M. and Averill-Bates, D.A., 2016, Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863, 2977-2992.

- Rocha, A. C., Camacho, C. Eljarrat, E. Peris, A. Aminot, Y. Readman, J. W. Boti, V. Nannou, C., Marques, A., Nunes, M.L., Almeida, C.M., 2018, Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environ Res*, 161, 354-363.
- Romero, A., Ares, I. Ramos, E. Castellano, V. Martinez, M. Martinez-Larranaga, M. R. Anadon A., Martinez M. A. 2015, Evidence for dose-additive effects of a type II pyrethroid mixture. In vitro assessment. *Environ Res*, 138, 58-66.
- Romero, A., Ramos, E., Ares, I., Castellano, V., Martinez, M., Martinez-Larranaga, M.R., Anadon, A., Martinez, M.A., 2017, Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol*, 91, 2151-2164.
- Sadowska-Woda, I., Wojcik, N., Karowicz-Bilinska, A., Bieszczad-Bedrejcuk, E., 2010, Effect of selected antioxidants in beta-cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*, 24, 879-84.
- Saillenfait, A. M., Ndiaye, D., Sabate, J.P., 2016, The estrogenic and androgenic potential of pyrethroids in vitro. Review. *Toxicol In Vitro*, 34, 321-32.
- Saito, K., Tomigahara, Y., Ohe, N., Isobe, N., Nakatsuka, I., Kaneko, H., 2000, Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms. *Toxicol Sci*, 57, 54-60.
- Salvagni, J., Ternus, R.Z., Fuentefria, A.M. 2011, Assessment of the genotoxic impact of pesticides on farming communities in the countryside of Santa Catarina State, Brazil. *Genet Mol Biol*, 34, 122-6.0
- Schnitzerling, H. J., Nolan J., Hughes S. 1989, Toxicology and metabolism of isomers of flumethrin in larvae of pyrethroid-susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*, 6, 47-54.
- Sevil, A., Aydınoglu, H. Temel, O. İkizunal K. Hüsnü E., 1991, Pestisit kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceği. *Turkish Journal of Entomology*, 15 (4) : 247-256.
- Sharifi, S., Barar, J. Hejazi M.S., Samadi, N., 2015, Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. *Adv Pharm Bull*, 5, 351-9.
- Sharma, P., Singh R. Jan M., 2014, Dose-dependent effect of deltamethrin in testis, liver, and Kidney of wistar rats. *Toxicology international*, 21, 131.
- Singh, N.P., McCoy, M.T. Tice R.R., Schneider E.L., 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175, 184-191.
- Skolarczyk, J., Pekar J., Nieradko-Iwanicka B., 2017, Immune disorders induced by exposure to pyrethroid insecticides. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 71, 446.

- Slowinski, J., Bierzynska-Macyszyn, G. Mazurek, U. Widel, M. Latocha, M. Stomal, M. Snietura M. Mrowka R. 2011, Cytokinesis-block micronucleus assay in human glioma cells exposed to radiation. *Image Analysis & Stereology*, 23, 159-165.
- Soderlund, D. M., Clark, J.M. Sheets, L.P. Mullin, L.S. Piccirillo, V.J. Sargent, D. Stevens J.T. Weiner M.L. 2002, Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171, 3-59.
- Soomro, A. M., Seehar, G.M., Bhanger M.I., Channa, N.A., 2008, Pesticides in the Blood Samples of Spray-workers at Agriculture Environment: *The Toxicological Evaluation. Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, 9, 32 – 37.
- Soto, A. M., Michaelson, C.L. Prechtel, N.V. Weill, B.C., Sonnenschein, C., Olea-Serrano F. Olea N. 1998, Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. *Reproductive Toxicology*, 444, 9-28.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995, The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, 103 Suppl 7, 113-22.
- Srivastava, A. K., Srivastava, P.K., Al-Khedhairi, A.A., Musarrat, J., Shukla, Y., 2012, Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutat Res*, 747, 22-8.
- Stanneck, D., Ebbinghaus-Kintscher, U. Schoenhense, E., Kruedewagen, E.M., Turberg, A., Leisewitz, A., Jiritschka, W., Krieger K.J., 2012a, The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasit Vectors*, 5, 73.
- Stanneck, D., Rass, J., Radeloff, I., Kruedewagen, E., Le Sueur, C., Hellmann, K., Krieger K., 2012b, Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto(R)) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicentre clinical field studies in Europe. *Parasit Vectors*, 5, 66.
- Suman, G., Naravaneni R., Jamil K., 2006, In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. *Indian J Exp Biol*, 44, 233-9.
- Sun, H., Xu, X., Xu, L., Song, L., Hong, X., Chen, J., Cui L., Wang X., 2007, Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere*, 66, 474–479.
- Sundaramoorthy, R., Velusamy, Y., Balaji, A.P., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2016, Comparative cytotoxic and genotoxic effects of permethrin and its nanometric form on human erythrocytes and lymphocytes in vitro. *Chem Biol Interact*, 257, 119-24.
- Taju, G., Abdul Majeed, S. Nambi, K.S., Farook, M.A., Vimal, S., Sahul Hameed, A.S., 2014, In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. *Pestic Biochem Physiol*, 113, 15-24.

- Tan, K., S. Yang, Z. Wang & R. Menzel (2013) Effect of flumethrin on survival and olfactory learning in honeybees. *PLoS One*, 8, e66295.
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu S., Yan, D., 2018, Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007.
- Tange, S., Fujimoto, N., Uramaru, N., Sugihara, K., Ohta, S., Kitamura, S., 2014, In vitro metabolism of cis- and trans-permethrin by rat liver microsomes, and its effect on estrogenic and anti-androgenic activities. *Environ Toxicol Pharmacol*, 37, 996-1005.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki Y.F., 2000, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-21.
- Vardavas, A. I., Stivaktakis, P.D., Tzatzarakis, M.N., Fragkiadaki, P., Vasilaki, F., Tzardi, M. Datseri, G., Tsiaoussis, J., Alegakis, A.K., Tsitsimpikou, C., Rakitskii, V.N., Carvalho, F., Tsatsakis, A.M., 2016, Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food Chem Toxicol*, 94, 250-9.
- Vural, N., 2005, Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. Ankara.
- Vichai V. and Kirtikara K., 2006, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 1(3):1112-6.
- Wang, T.T. and Phang J.M., 1995, Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res*, 55, 2487-9.
- Welshons, W.V., Wolf, M.F., Murphy, C.S., Jordan, V.C., 1988, Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol*, 57, 169-78.
- WHO., 2010, The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009.
- Wielogorska, E., Elliott, C.T., Danaher, M., Connolly, L., 2015, Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants. *Toxicol In Vitro*, 29, 211-20.
- Wolansky, M.J., Gennings C., Crofton K.M., 2006, Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicol Sci*, 89, 271-7.
- Xu, L.C., Liu, L., Ren, X.M., Zhang, M.R., Cong, N., Xu, A.Q., Shao, J.H., 2008 Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro. *Toxicology*, 243, 59-65.
- Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Song, L. Wang X.R., 2006, Androgen receptor activities of p,p'-DDE, fenvalerate and phoxim detected by androgen receptor reporter gene assay. *Toxicol Lett*, 160, 151-7.

- Yang, Y., Gao, J., Zhang, Y., Xu, W., Hao, Y., Xu, Z., Tao, L., 2018, Natural pyrethrins induce autophagy of HepG2 cells through the activation of AMPK/mTOR pathway. *Environ Pollut*, 241, 1091-1097.
- Yared, E., McMillan, T.J., Martin, F.L., 2002, Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*, 17(4):345-52.
- Ye, X., Pan, W., Zhao, Y., Zhao, S., Zhu, Y., Liu, W., Liu, J., 2017, Association of pyrethroids exposure with onset of puberty in Chinese girls. *Environ Pollut*, 227, 606-612.
- Yilmaz, M., Rencuzogullari, E., Canli, M., 2015, The effects of cyfluthrin on some biomarkers in the liver and kidney of Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4747-4752.
- Yu, L., Liu, F., Wu, H., Tan, H., Ruan, X., Chen, Y., Chao, Z., 2015, Flumethrin Residue Levels in Honey from Apiaries of China by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Protection*, 78, 151-156.
- Yurdakok-Dikmen, B., Tekin K., Tırpan M.B., 2017, In Vitro Toxicity of Some Pesticides on Goat and Dog Spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23, 297-303.
- Zhang, J., Zhu, W., Zheng, Y., Yang, J., Zhu, X., 2008, The antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides cyfluthrin and beta-cyfluthrin. *Reprod Toxicol*, 25, 491-6.
- Zhang, P., Suidasari, S., Hasegawa, T., Yanaka, N., Kato, N., 2014, Vitamin B(6) activates p53 and elevates p21 gene expression in cancer cells and the mouse colon. *Oncol Rep*, 31, 2371-6.
- Zhao, M., Zhang, Y., Liu, W., Xu, C., Wang, L., Gan, J., 2008, Estrogenic activity of lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Toxicol Chem*, 27, 1194-200.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	SimgeKara Ertekin
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	27.07.1985
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	(532)7499492
E-Posta Adresi	Simgekara_@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	01.06.2007

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Fakültesi
Anabilim Dalı	Biyoloji Bölümü
Programı	Zooloji

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	
Kara Ertekin, S., Yazar, S., Erkan, M., (2019) The Effects Of Flumethrin On Cytotoxicity And Micronucleus Formation. 3. International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences (ICAFOP 2019/Trabzon)- Sözlü bildiri	