

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDÜKLENMİŞ TOKSİSİTEYE KARŞI *ZINGIBER*
OFFICINALE EKSTRAKTININ KORUYUCU
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : DAMLA HİMTAŞ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : PROF. DR. EMİNE YALÇIN

Şubat 2022
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDÜKLENMİŞ TOKSİSİTEYE KARŞI *ZINGIBER*
OFFICINALE EKSTRAKTININ KORUYUCU
ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DAMLA HİMTAŞ

Enstitü Anabilim Dalı

:

BİYOLOJİ

Bu tez 11/02/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Üye**

**Dr. Öğretim Üyesi
Dilek ÇAVUŞOĞLU
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

DAMLA HİMTAŞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilimsel alandaki kıymetli birikimlerini büyük bir fedakârlık ile paylaşan danışmanım Sayın Prof. Dr. Emine YALÇIN'a,

Engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU'na,

Moleküler doking analizlerindeki yardımlarından dolayı Dr. Öğretim Üyesi Ali ACAR'a

Eğitimim sırasında ellerini her daim omuzumda hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Permetrin.....	5
2.2. Permetrinin etki mekanizması ve metabolizması.....	7
2.3. Permetrin toksisitesi.....	8
2.4. Literatür çalışmaları.....	11
2.5. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	13
2.5.1. <i>Zingiber officinale</i> 'nin fitokimyasal içeriği ve biyolojik etkileri.....	14
2.5.2. Literatür çalışmaları.....	17
2.6. <i>Allium</i> testi.....	18
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. <i>Zingiber officinale</i> ekstraksiyonu.....	21
3.2. Deneysel grupların oluşturulması.....	21
3.3. Deneysel planlama.....	22
3.4. Fizyolojik parametreler.....	22
3.5. Sitogenetik parametreler.....	23

3.6. Antioksidan/oksidan dinamik.....	23
3.7. Zoex'in koruyucu özelliği.....	24
3.8. Anatomik incelemeler.....	25
3.9. Moleküler doking.....	25
3.9. İstatiksel analiz.....	25
 BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	 26
4.1. Fizyolojik parametreler.....	26
4.2. Sitogenetik parametreler	28
4.3. Permetrinin moleküler doking destekli genotoksisite mekanizması.....	33
4.4. Antioksidan/oksidan dinamik.....	36
4.5. Anatomik hasarlar.....	40
 BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	 43
 KAYNAKLAR.....	 46
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon transferaz
KA	: Kromozomal anormallik
KAT	: Katalaz
LOO•	: Lipid peroksil radikali
MDA	: Malondialdehit
MI	: Mitotik indeks
MN	: Mikronukleus
PER	: Permetrin
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TNF α	: Tümör nekrozis faktör
Zoex	: <i>Zingiber officinale</i> ekstraktı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.2. Cis ve trans permetrinin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 2.3. Permetrin kaynaklı oksidatif stres ve etkileri	9
Şekil 2.4. <i>Z. officinale</i> 'ye ait yaprak, çiçek ve yumru.....	14
Şekil 2.5. <i>Z. officinale</i> ekstraktında bulunan bazı aktif bileşikler.....	15
Şekil 3.1. Deneysel planlama.....	22
Şekil 4.1. Permetrin ve Zoex'in <i>A. cepa</i> 'da MI oranları üzerine etkileri.....	30
Şekil 4.2. Zoex uygulamasının MN ve KA oluşumlarına karşı koruyucu rolü.....	32
Şekil 4.3. Permetrin-tubulin ve permetrin-histon proteinlerinin etkileşimi.....	33
Şekil 4.4. Permetrin-DNA etkileşimi (BNA, b:195D, c:1CP8).....	35
Şekil 4.5 Permetrinin sebep olduğu meristematik hücre hasarları.....	42

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Permetrinin kimyasal yapısı ve özellikleri.....	6
Tablo 2.2. Permetrin ile ilgili yapılmış literatür çalışmaları.....	12
Tablo 2.3. <i>Zingiber officinale</i> 'ye ait bilimsel sınıflandırma.....	13
Tablo 4.1. Permetrin ve Zoex'in fizyolojik parametreler üzerine etkisi.....	28
Tablo 4.2. Permetrinin teşvik ettiği genotoksisiteye karşı Zoex'in koruyucu rolü...	31
Tablo 4.3. Permetrin-DNA etkileşiminde bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti..	36
Tablo 4.4. Permetrin ve Zoex uygulamasının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi.....	40
Tablo 4.5 Permetrinin teşvik ettiği anatomik hasarlara karşı Zoex'in koruyucu rolü.....	42

İNDÜKLENMİŞ TOKSİSİTEYE KARŞI *ZINGIBER OFFICINALE* EKSTRAKTININ KORUYUCU ROLÜNÜN BELİRLENMESİ

ÖZET

Verim ve ürün kalitesi üzerine olumlu etkileri yanında pestisitler hedef dışı canlılar üzerinde toksik etki sergileyebilmektedir. Bu çalışmada *Allium cepa*'da permetrin insektisiti tarafından indüklenen toksik etkiler ve bu toksik etkilere karşı *Zingiber officinale* ekstraktının (Zoex) koruyucu rolü araştırılmıştır. Bu kapsamda 6 farklı grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu çeşme suyu ile, Grup II ve Grup III sırasıyla 10µg/mL Zoex ve 20µg/mL Zoex ile, Grup IV'e ait bulblar 100 µg/L permetrin ile muamele edilmiştir. Zoex'in permetrin toksisitesine karşı koruyucu özelliği doza bağlı olarak araştırılmış ve bu amaçla oluşturulan Grup V ve Grup VI sırasıyla 10µg/mL Zoex+100 µg/L permetrin ve 20µg/mL Zoex+100 µg/L permetrin ile çimlendirilmiştir. 72 saat sürelik çimlenme sonrasında kök ucunda sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik değişimler araştırılmıştır. Bulblarda çimlenme oranları, kök uzaması ve ağırlık artışı da incelenerek fizyolojik değerlendirme yapılmıştır. Sonuç olarak permetrin uygulamasının kök ucu hücrelerinde mitotik indeksi azalttığı, mikronukleus ve kromozomal anormalliklerin sıklığını arttırdığı belirlenmiştir. Kök ucu hücrelerinde malondialdehit oranlarının artması, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerinin azalması permetrinin oksidatif hasara yol açtığına işaret etmektedir. Kontrol grubuna kıyasla permetrin uygulanan grupta kök uzamasında %68,5, ağırlık kazanımında ise %81,8 azalma tespit edilmiştir. Tüm bu anormallikler kök anatomisindeki değişimlerle de paralellik sergilemiştir. Permetrin uygulanan kök ucu hücrelerinde epidermis hücre hasarı, yassılaşmış hücre çekirdeği, korteks hücre hasarı, korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma ve belirgin olmayan iletim doku gibi anormallikler tespit edilmiştir. Permetrin ile birlikte Zoex uygulamasının saptanan tüm anormalliklerde gerileme ve anatomik hasarların sıklığında azalma, MI oranlarında ise iyileşme sağladığı saptanmıştır. En belirgin iyileşme 20µg/mL Zoex uygulanan Grup VI'da tespit edilmiş ve Zoex'in doza bağlı bir koruma sergilediği de belirlenmiştir. Ayrıca moleküler doking çalışmaları ile permetrinin toksisite mekanizması da aydınlatılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen verilerden permetrinin hedef dışı bir canlı olan *A.ceph* üzerinde toksik etkilere neden olduğu, Zoex'in ise bu etkileri azaltarak koruyucu bir rol üstlendiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Permetrin, *Zingiber officinale*, mitotik indeks, mikronukleus, oksidatif hasar, moleküler doking

DETERMINATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF *ZINGIBER OFFICINALE* EXTRACT AGAINST INDUCED TOXICITY

SUMMARY

Pesticides can have toxic effects on non-target organisms in addition to its positive effects on yield and product quality. In this study, the toxic effects induced by permethrin insecticide on *Allium cepa* and the protective role of *Zingiber officinale* extract (Zoex) against these toxic effects were investigated. In this context, 6 different groups were formed. While the control group was treated with tap water, Group II and Group III were treated with 10µg/mL Zoex and 20µg/mL Zoex, respectively, Group IV was treated with 100µg/L mg permethrin. The protective feature of Zoex against permethrin toxicity was investigated depending on the dose, and Group V and Group VI formed for this purpose were germinated with 10µg/mL Zoex+100µg/L permethrin and 20µg/mL Zoex+100µg/L permethrin, respectively. After 72 hours of germination, cytogenetic, biochemical and anatomical changes in meristematic cells of *A. cepa* were investigated. Physiological evaluation was made by examining the germination rates, root elongation and weight gain in bulbs. As a result, it was determined that permethrin application decreased the mitotic index in root tip cells and increased the frequency of micronucleus and chromosomal abnormalities. Increase in malondialdehyde levels, decrease in glutathione, superoxide dismutase and catalase levels in root tip cells indicate that permethrin causes oxidative damage. Compared to the control group, a decrease of 68,5% in root elongation and 81,8% in weight gain were detected in the permethrin applied group. All these abnormalities followed a parallel course with the changes in root anatomy. Abnormalities such as epidermis cell damage, flattened cell nucleus, cortex cell damage, thickening of the cortex cell walls and indistinct vascular tissue were detected in permethrin-treated root tip cells. It was determined that the application of Zoex together with permethrin provided regression in all detected abnormalities, a decrease in the frequency of anatomical damage, and an improvement in MI rates. The most significant improvement was found in Group VI treated with 20µg/mL Zoex, and Zoex was also found to exhibit dose-dependent protection. And also toxicity mechanism of permethrin was elucidated with molecular docking studies. From the data obtained as a result of the study, it was determined that permethrin causes toxic effects on *A. cepa*, which is a non-target organism, while Zoex plays a protective role by reducing these effects.

Keywords: Permethrin, *Zingiber officinale*, mitotic index, micronucleus, oxidative damage, molecular docking

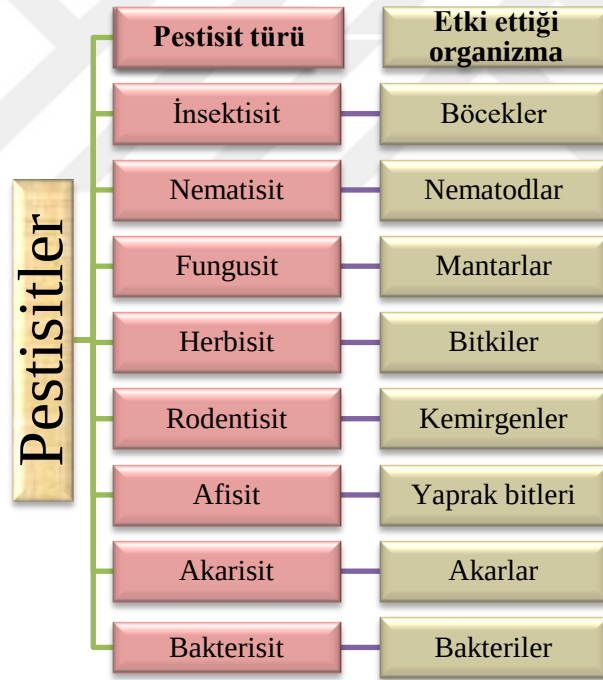
BÖLÜM 1. GİRİŞ

Tarımsal uygulamalarda ürünlerin kalitesinin ve birim alandan elde edilen verimin arttırılması amacıyla pek çok teknik kullanılmaktadır. Mikroorganizmalara, böceklerle, çeşitli hastalıklara ve yabancı otlara karşı uygulanan kimyasal mücadelede bu tekniklerden biridir. Tüm mücadele yöntemleri arasında kimyasal mücadele %95 gibi yüksek bir paya sahiptir ve günümüzde de geçerliliğini korumaktadır. Kimyasal mücadelede yaygın olarak pestisitler kullanılmaktadır ve bu yolla ürünlerin veriminde ve kalitesinde oluşabilecek zararların önüne geçilebilmektedir [1, 2]. Hedef canlılara göre yapısal değişiklik gösteren pestisitlerin kullanımı her geçen gün artmış, sentetik pestisitlerin üretilmesi ile birlikte yoğun bir pestisit kirliliği de oluşmuştur. Tarımsal uygulamalarda kullanılan pestisitler sızıntı ve/veya erozyon yoluyla da su kütlelerine ulaşabilmektedir. Ayrıca sürüklenme, buharlaşma ve rüzgar erozyonu pestisit kalıntılarını atmosfere taşıyabilmekte, bu yolla uygulama alanından çok uzakta bulunan yüzey sularının ve toprağın kirlenmesine de neden olmaktadır. Pek çok pestisit ekosistemler arasında taşınarak kümülatif özellik sergilemekte ve birçok canlı organizmada birikerek besin zincirleri yoluyla da organizmalar arasında taşınabilmektedir [2, 3]. Piretroidler pestisitlerin geniş bir sınıfını oluşturmaktadır ve krizantem bitkisinin kurutulmuş çiçeklerinin ekstraksiyonu ile elde edilen doğal bir insektisit grubudur. Ancak doğal piretroidler ışığa dayanıksız özelliği ve çevrede çabuk bozundukları için zamanla yerini sentetik piretroidlere bırakmıştır. Permetrin, sentetik piretroid kimyasal sınıfında yer almaktadır ve tip I piretroid olarak tanımlanmaktadır. Permetrin tarım alanı ve hayvancılık gibi sektörlerde pirelerden, mikroorganizmalardan ve parazitlerden korunma amacıyla kullanılmaktadır. Tarımdan sonra endüstriyel alanlarda da kullanılan permetrin özellikle hazır giyim sektöründe de giysilerin böcek ve haşerelerden korunması amacıyla kullanılmaktadır. Permetrin baş biti, pire ve özellikle uyuz gibi parazitlerin tedavisinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur ve bu amaçla uyuz kremlerinde, uyuz sabunlarında ve

uyuzla alakalı her türlü bakım ve tedavi ürünlerinin içeriğinde de bulunmaktadır [3]. Yaygın kullanımı nedeniyle permetrin çevreye çeşitli yollarla kontamine olmakta ve hedef dışı canlılar üzerinde de toksik etki sergilemektedir. Permetrin maruziyeti hedef dışı canlılarda antioksidan sistem dengesinde bozulmaya, DNA, lipid ve protein gibi makromoleküllerde oksidatif hasara neden olmaktadır [4]. Bu çalışmada permetrinin hedef dışı organizmalardan olan *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde oluşturduğu toksik etkiler farklı parametreler kullanılarak çok yönlü olarak araştırılmıştır. Antioksidan özellikli doğal ürünler organizmalarda maruz kalınan kimyasal yük nedeniyle bozulan antioksidan dengeyi düzenlemektedir. Bu kapsamda çalışmada permetrinin toksik etkilerine karşı antioksidan özelliğe sahip olan *Zingiber officinale*'nin de toksisiteyi azaltıcı etkisi araştırılmıştır. *Zingiber officinale* antik çağlardan beri soğuk algınlığı, öksürük, çeşitli enfeksiyonlar, ateş, astım, bronşit, iştahsızlık, artrit, romatizma, ödem, ağrı, kramp, bulantı, kusma, şişkinlik, gastrit, peptik ülser, bağırsak parazitleri, basur, kabızlık ve diğer bazı sindirim sorunları, hipertansiyon, bunama, dismenore, inme, diyabet ve çeşitli sinir sistemi rahatsızlıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Toz haline getirilmiş rizom %3-6 lipid, %9 protein, %60-70 karbonhidrat, %3-8 ham lif, yaklaşık %8 kül, %9-12 su ve %2-3 uçucu yağ içermektedir [5, 6]. Zencefilde bulunan mineraller demir, kalsiyum ve fosfordur. Ayrıca tiamin, riboflavin, niasin ve C vitamini gibi vitaminler de içermektedir [7]. Bu çalışmada permetrin toksisitesi ve bu toksisiteye karşı *Z. officinale*'nin koruyucu özelliği *Allium* testi ile incelenmiştir. *Allium* testi çevre kirliliğinin ve toksik ajanların etkilerinin incelendiği biyoindikatör olarak kullanılan bir testtir ve memelilerde gerçekleştirilen toksisite testleri ile yüksek korelasyon göstermektedir [8]. *Allium* testi çeşitli doğal ya da sentetik bileşenlerin sadece sitolojik ya da genetik etkilerinin değil aynı zamanda fizyolojik, klastojenik, aneugenik, anatomik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Bu noktadan hareketle bu çalışmada permetrin ve *Z. officinale*'nin *A. cepa* üzerindeki etkileri fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik açıdan incelenmiştir. *Z. officinale*'nin koruyucu özelliği içerdiği bileşenler ile ilişkilendirilmiş ve koruyucu özelliğinin mekanizması moleküler doking çalışmaları ile desteklenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Pestisitler zararlı organizmaların etkilerini azaltmak ve engellemek amacıyla kullanılan karışımlardır. Zararlı organizmaların çoğalması pestisitler sayesinde kontrol altına alınabilmektedir. Pestisitler etki alanına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Etki ettikleri canlı gruplarına göre pestisitler insektisit, akarisit, nematisit, mollusisit, rodentisit, avisit, afisit, algisit, bakterisit, herbisit ve fungusit şeklinde alt sınıflara ayrılmaktadır [9].



Şekil 2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması

İnsektisitler halk ağzıyla böcek ilacı olarak bilinen bir tür pestisit çeşididir. Böceklerin yumurta ve larvalarına etki ederek böceklerin oluşumunu engeller. Özellikle tarımda verimliliği artırmak amacıyla insektisitler yaygın olarak

kullanılmaktadır. Akarisitler, kene ya da *Accarina* alt türüne sahip eklembacaklılara etki etmektedir. Özellikle nemli ve kirli ortamlarda akarisitlerin bıraktıkları yumurtalara zarar vererek yayılmalarını engellemektedir. Kırım kongo kanamalı ateşi hastalığına sebep olan kene türleri için kullanılan ilaçlar bir tür akarisittir. Nematosisitler, nematodlara yani toprakta, suda ve çürümekte olan organik atıklarda yaşayan yuvarlak (ipliksi) solucanlar üzerine etki etmektedir. Nematodlar bitkileri besin olarak kullandıkları için genellikle bitki kök sistemine zarar verirler. Bu sebeple tarımda oldukça zararlıdır ve bu zararın önüne geçmek amacıyla nematisitler tarımsal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mollusisitler yumuşakçalara karşı kullanılan zehirdir. Salyangoz, sümüklü böcek gibi canlıları öldüren pestisit çeşididir. Rodentisitler, kemirgenlere karşı kullanılan pestisittir. Fare zehiri olarak da bilinen rodentisitlerin hayvanlar tarafından tüketilmesi tehlikeli ve ölümcüldür. Avisitler, tarımda kanatlı haşereleri kontrol etmek için kullanılan pestisit çeşididir. Karayollarında, havaalanlarında, trenyollarında kuşları korkutmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Küçük dozlarda hipnotik etkiyle birlikte caydırıcı olsa da büyük dozlar öldürücü etkiye sebebiyet verebilmektedir. Afisitler tarımda ve süs bitkisi yetiştiriciliğinde yaprak bitlerinden korunmak amacıyla kullanılmaktadır. Algisit kullanımında alglerle mücadele hedeflenmektedir ve özellikle rezervuarların, kanalların, yüzme havuzlarının temizliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakterisitler, patojenlerin gelişimini yok etmek veya durdurmak için tasarlanmış maddelerdir. Bu gruba antiseptikler ve antibiyotikler de dahildir. Herbisitler, yabancı otları ve gereksiz bitkileri kontrol etmek için kullanılan pestisitlerdir. Fungusitler mantar hastalıklarının tedavisine yönelik kullanılan mantar önleyici pestisitlerdir [9, 10].

İnsektisitler özellikle tarımsal mücadelede yaygın olarak kullanılan pestisit grubudur ve inorganik, organik ve biyo insektisitler olmak üzere kimyasal yapılarına göre üç gruba ayrılmaktadır. İnorganik insektisitler yapısında karbon içermemektedir. Kurşun ve arsenik gibi ağır metal içerenler, kükürt ya da bakır çözeltilerinden oluşan insektisitler inorganik sınıfta yer almaktadır. Yapısında karbon atomu içeren, halkasal ya da düz zincir yapısına sahip organik insektisitler en yaygın kullanılan gruplardandır. Hayvan, bitki, bakteri ve bazı mineraller gibi doğal materyalden elde

edilen insektisitler, biyoinsektisitler grubunu oluşturmaktadır. İnsektisitler grubunda organik yapıda olan türler yüksek çeşitliliğe sahiptir. Klorlandırılmış hidrokarbonlar, organik fosfatlılar, karbamatlar ve sentetik piretroitler organik insektisitlerin alt grubunu oluşturmaktadır [11].

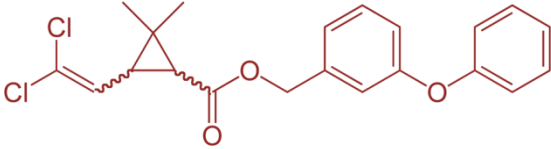
Piretroidler, krizantem bitkisinin kurutulmuş çiçeklerinin ekstraksiyonuyla elde edilen doğal ve organik yapıda bir insektisittir. Ancak doğal piretroidler ışığa dayanıksız ve çevrede çok çabuk bozundukları için kullanım imkanları sınırlıdır. Bu nedenle bozulmaya karşı dirençli olarak geliştirilen sentetik piretroidler böceklere karşı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sentetik piretroidler arasında permetrin ve sipmetrin yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11].

2.1. Permetrin

Permetrin, sentetik piretroid kimyasal sınıfında yer almaktadır ve tip I piretroid olarak tanımlanmaktadır. Piretroidler, *Chrysanthemum cinerariaefolium*'den elde edilen doğal piretrinlerin türevidir. Doğal piretrinler gün ışığı, ultraviyole ışık, asit ve bazlar tarafından kolaylıkla bozulurlar. Yapılarının kolayca bozulması ve maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle, doğal piretrin yapısında bulunan karbon, hidrojen ve oksijen moleküllerine azot, sülfür, alogen grupları eklenerek etkileri ve stabiliteleri arttırılmış ve sentetik piretrinler elde edilmiştir. Bu sentetik piretrinlerin türevlerine piretroidler adı verilir [3, 12]. Permetrin tarımsal ilaçlamada özellikle böcek ilaçlarında yaygın bir şekilde kullanılan bir piretroid insektisit türüdür. İnsektisit olarak tarımsal uygulamalarda bitkileri korumak amacıyla, endüstriyel alanlarda ve evlerde böceklerin kontrolü için, hayvancılıkta ise parazitleri öldürmek amacıyla kullanılmaktadır. Böcek kovucu özelliğinden faydalanan permetrin ağaçların tedavisinde, kereste işleme sektöründe, hazır giyim alanında koruyucu olarak ve evcil hayvan barınaklarında pire önleyici amaçlarıyla kullanılmaktadır [3, 13]. Organik bir bileşik olan permetrinin genel formülü $C_{12}H_{20}Cl_2O_3$ 'dür. Renksiz kristaller halinde görünüme sahip olan permetrin 391,28 g/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Permetrinin kimyasal yapısı ve özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir [14, 15].

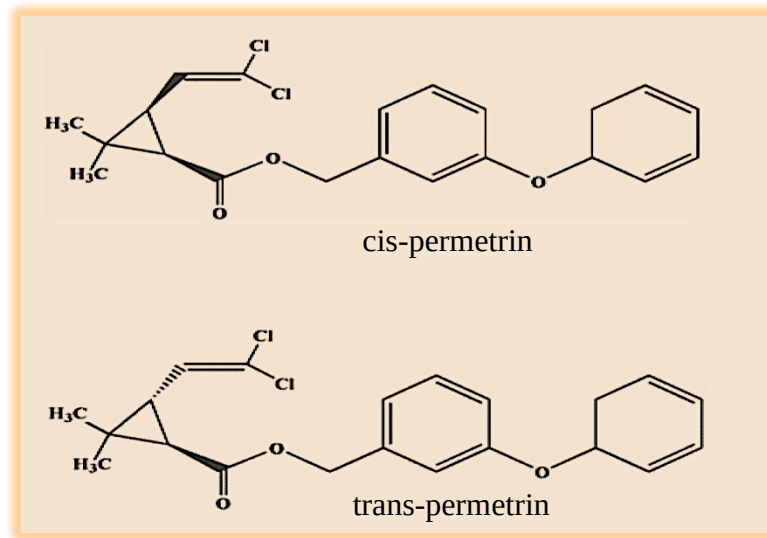
Permetrin baş biti, pire ve özellikle uyuz gibi parazitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır. Uyuz hastalığı, uyuz böceği olarak bilinen *Sarcoptes scabiei* akarın neden olduğu bulaşıcı bir deri hastalığıdır. Permetrin uyuz kremlerinde, uyuz sabunlarında ve uyuzla alakalı her türlü bakım, tedavi ürünlerinin içeriğinde de bulunmaktadır. Bunun yanında permetrin ayrıca tarım alanı ve hayvancılık gibi sektörlerde pirelerden, mikroorganizmalardan, parazitlerden korunma amacıyla kullanılmaktadır. Yine endüstride hazır giyim sektöründe de üretilen giysilerin böcek ve haşerelerden korunmasını sağlar. Ev hayvanlarını da pirelerden korumak için kullanılır ancak bu ev hayvanlarında permetrin zehir etkisi oluşturabilmektedir. Çiftliklerde, fırınlarda, logarlarda, sağlıkta ve daha birçok alanda kullanımı yaygındır. İleri teknoloji yöntemleri kullanılarak üretilen permetrin, sentetik polimer bileşiklerden birisi olup birçok canlı organizma için toksik etkiye sahiptir. Hedef dışı organizmalarda ciddi etki yaratmaktadır ve insanlarda göz, deri ve akciğerde tehlike oluşturabilmektedir [3, 12, 13].

Tablo 2.1. Permetrinin kimyasal yapısı ve özellikleri

			
IUPAC adı	3-Phenoxybenzyl	(1RS)-cis,trans-3-(2,2-dichlorovinyl)	-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
CAS numarası	52645-53-1		
Molekül formülü	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃		
Molekül kütlesi	391,28 g/mol		
Görünüm	Renksiz kristal		
Yoğunluk	1,19 g/cm ³		
Erime sıcaklığı	34°C		
Kaynama noktası	200		

2.2. Permetrinin etki mekanizması ve metabolizması

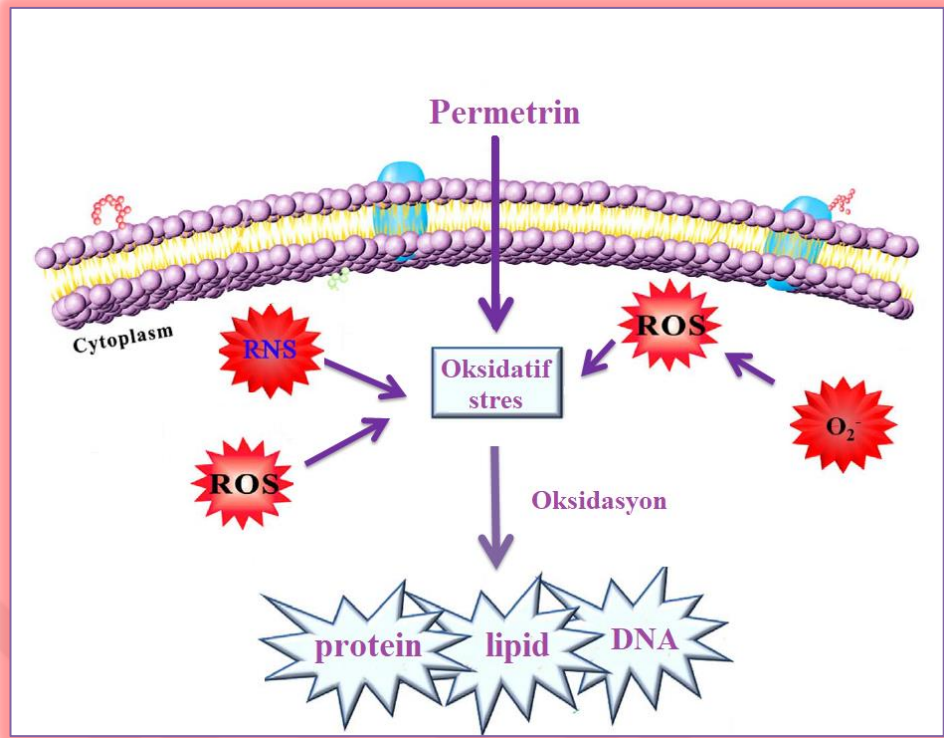
Permetrin hedef organizmalarda sodyum kanalları, reseptör-iyonofor kompleksleri ve nörotransmitterler ile etkileşerek nörotoksik etki sergilemektedir. Permetrin, sinir hücrelerinin zarında repolarizasyon sırasında iyon (Na) kapılarının kapanmasını bloke etmektedir. Bu etki sinir uyarılarının iletimini bozmakta ve zarların kendiliğinden depolarizasyonuna veya tekrarlayan deşarjlara neden olmaktadır. Permetrinin bu etkilerine karşı duyu ve sinir hücreleri özellikle daha çok duyarlıdır. Permetrin hedef organizmalarda, düşük konsantrasyonlarda hiperaktiviteye, yüksek konsantrasyonlarda felç ve ölüme neden olmaktadır [3]. Hedef dışı organizma olan canlılardan insanlarda, permetrin hidrolitik parçalanma ve oksidasyon yolları ile detoksifiye edilmektedir. Permetrinin karboksilesterazlar tarafından hidrolize edildiği ya da sitokrom P450 tarafından okside edilerek metabolize edildiği bilinmektedir [16, 17]. Permetrinin cis ve trans olmak üzere iki izomerik formu bulunmaktadır ve detoksifikasyon sonucunda memelilerde düşük toksisite sergilemektedir (Şekil 2.2). Cis ve trans permetrin karaciğer mikrozomları ve ayrıca ince bağırsak mikrozomları tarafından hidrolize edilmektedir [18]. Permetrin özellikle CYP450 gibi detoksifikasyon enzimlerin indüksiyonunu da sağlamaktadır. Heder ve arkadaşları permetrin varlığında hepatositlerde CYP2B1 and CYP3A1 enzimlerinin indüklendiğini belirtmişlerdir [19].



Şekil 2.2. Cis ve trans permetrinin kimyasal yapıları [20]

2.3. Permetrin toksisitesi

Permetrinin toksisitesi büyük ölçüde cis:trans izomer oranlarına bağlıdır (genellikle 80:20; 40:60; 25:75). Cis izomerleri biyolojik olarak daha aktiftir, fakat aynı zamanda trans izomerlerden daha toksiktir. Farelerde yapılan çalışmalar, oral cis-permetrinin trans-permetrinden 10 kat daha toksik olduğunu göstermiştir [3]. Permetrin maruziyeti hedef dışı canlılarda antioksidan sistemin gücünü azaltarak DNA, lipid ve protein gibi makromoleküllere zarar vermektedir (Şekil 2.3) [20, 21]. Permetrinin oluşturduğu oksidatif stres apoptotik ya da nekrotik yollarla hücre ölümüne de neden olmaktadır. Proteinler, permetrin tarafından indüklenen oksidatif stresten etkilenen önemli makromoleküllerdir. Proteinler oksidatif stres sonucunda okside olabilmekte ve protein yapısında bulunan aminoasitlerden histidin 2-oksohistidine, triptofan kinurenin veya N-formilkinürenine, tirozin dihidroksi türevlerine, metiyonin metiyonin sülfoksite veya metiyonin sülfon türevlerine, sistein kalıntıları disülfid türevlerine, lösin ve valin hidroksi türevlerine dönüşmektedir ve aminoasitlerdeki bu modifikasyon protein yapısında bozulmalara neden olmaktadır [20, 22]. Permetrin tarafından indüklenen oksidatif stres sonucunda karbonil proteinlerinin oluşumunun arttığı bilinmektedir [23]. Amino asitler (özellikle histidin, arginin, lizin ve prolin) ROS tarafından saldırıya uğradığında protein yapısında karbonil grupları (protein-C=O) oluşturmaktadır. Protein karbonilleri, protein omurgasındaki oksidatif bölünmeden; lizin, arginin, histidin, prolin, glutamik asit ve treonin gibi amino asitlerin doğrudan oksidasyonundan veya lipid peroksidasyonu sonucu üretilen aldehitlerin bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Proteinlerde hasar oluşumu sonrasında DNA tamir mekanizmasında olduğu gibi bir tamir sistemi bulunmamaktadır. Tamir yerine, hasarlı proteinler katepsin c, kalpain, tripsin gibi endojen proteazların etkisiyle amino asit bileşenlerine parçalanmaktadır. Proteinlerin oksitlenmiş formlarının hücre içi birikimi dokuda ve organizmada çeşitli anormalliklere yol açmaktadır [20, 24].



Şekil 2.3. Permetrin kaynaklı oksidatif stres ve etkileri [20]

Hücrelerin permetrin insektisine maruziyetinde DNA hasarlarının olduğu da bilinmektedir. Permetrin özellikle 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumunu indükleyerek DNA hasarına yol açmaktadır. Özellikle permetrinin pürin bazlarında oksidatif hasara yol açarak DNA'da anormallikler oluşmasına neden olmaktadır [20]. Oksidatif stres faktörlerinden biri olan hidroksil radikalleri DNA yapısında yer alan bazlardaki çift bağa H atomu ekleyerek DNA yapısında modifikasyona neden olur. Ayrıca DNA'da bulunan 2-deoksiribozun C-H bağlarından bir H atomu kopararak ya da timin bazının yapısındaki metil grubundan H atomu çıkararak DNA yapısında bozulmalara neden olmaktadır [25]. Hidroksil radikali etkisi ile farklı derecelerde okside olmuş DNA ürünleri ortaya çıkar. Bu okside ürünlerin içerisinde en iyi bilinen 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir. Permetrin toksisitesinin 8-OHdG oluşumuna neden olarak DNA hasarı oluşturduğu bazı literatür çalışmaları ile kanıtlanmıştır. 8-OHdG ürünü, hidroksil radikallerinin guanin bazı ile etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğramış DNA, hasar miktarının belirlenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır [26].

Permetrin ve 3-fenoksi-benzil alkol, 3-fenoksibenzilaldehit ve 3-fenoksibenzoikasit gibi permetrin metabolitleri lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır. Lipid peroksidasyonu protein ve DNA oksidasyonundan farklı olarak zincirleme rekasyonları ile ilerleyebilen bir süreçtir. Lipid peroksidasyonunun başlatılması lipid molekülünden hidrojen atomunun koparılması ile tetiklenmektedir. Fosfolipidler (en bol bulunan membran lipidleri) radikallere ve peroksidasyona karşı hassastır çünkü yağ asidindeki çift bağ -CH bağını zayıflatır ve H⁺ çıkarımını kolaylaştırmaktadır. Bir H kaybeden lipid molekülü (L•) O₂'yi aktive ederek oksijen merkezli bir 'lipid peroksil radikali' (LOO•) oluşturmakta ve LOO• bir H molekülü alıp kararlı hale geçebilmek için komşu bir yağ asidinden H⁺ kopararak lipid peroksidasyonunun ilerlemesini sağlamaktadır [27]. Lipid peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA) gibi reaktif ürünler oluşabilmektedir. MDA, nükleik asitlerle etkişimlere girerek DNA'da çerçeve kayması ve yanlış baz eşleşmeleri gibi mutasyonlara neden olan pirimido-[1,2- α]purin-10(3H)-on deoksiriboz gibi ara ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yolla MDA mutajenik etki de sergilemektedir [28]. MDA'nın DNA'da zincirler arası çapraz bağlar oluşturma yeteneğine sahip olduğu ve alternatif bir genotoksik etkinin bu yolla oluştuğu da rapor edilmiştir [29]. Permetrin direkt olarak lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre bütünlüğünün bozulmasına, MDA yoluyla indirekt yollarla genotoksik etkiye neden olmaktadır.

PER'in antioksidan sistem üzerinde de toksik etkileri bulunmaktadır. Özellikle hücre içindeki antioksidan seviyelerinde önemli değişimlere neden olmaktadır. Genel olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzim aktivitelerinde artışa neden olan PER; bazı dokularda SOD gibi enzim düzeylerini azalttığı da rapor edilmektedir. Bu sonuç PER metabolizmasının dokuya spesifik etki sergilemesi ile ilişkilidir. PER, hücrelerde total oksidan yükte artışa, total anti-oksidan kapasitede azalışa neden olarak antioksidan dengede kaymalara sebep olmaktadır [30]. PER'in güçlü bir antioksidan olan GSH düzeyini azaltarak da antioksidan savunma sistemi dengesini bozduğu da rapor edilmektedir [31]. Glutatyon (GSH), canlı organizmalarda birden fazla işlevi olan bir tripeptiddir (L--

glutamil-L-sisteinil-glisin). Sistein kalıntısı formunda aktif bir tiyol grubunun bir taşıyıcısı olarak, ya reaktif oksijen/azot türleri (ROS ve RNS, karşılık) ve elektrofiller ile doğrudan etkileşime girerek ya da çeşitli enzimler için bir kofaktör olarak çalışarak bir antioksidan görevi görür [32, 33]. Hücrede glutatyon (GSH) düzeyinin azalması total antioksidan kapasitenin düşmesine ve hücrede oksidatif hasarın oluşmasına yol açar. Permetrinin glutatyon düzeyini azaltıcı etkisi hücrede oksidatif hasar oluşumunun indüklenmesine neden olur.

Permetrin, yüksek aktivitesi ve düşük memeli toksisitesi nedeniyle büyük ölçüde kullanılan önemli bir insektisittir [31]. PER'nin düşük memeli toksisitesi gösterdiğine inanılsa da, artan sayıda çalışma PER'nin hayvanlarda ve insanlarda nörotoksosite gibi çeşitli toksisitelere neden olabileceğini göstermiştir. Permetrin, insektisit olarak etkili bir bileşik olduğu kadar hedef dışı organizmalarda da toksik özellik sergilemektedir. Etken madde olan permetrin, allerjik reaksiyonları önemli derecede tetiklemektedir. Permetrin, tüm sentetik piretroidler gibi balıklar ve suda yaşayan omurgasızlar için son derece toksiktir. Permetrin, fotodegradasyona karşı oldukça dirençlidir, yani güneş ışığına maruz kaldığında oldukça yavaş parçalanır. Permetrin toprak parçacıklarına bağlanma eğilimindedir ve toprak bakterileri permetrinin biyolojik olarak parçalanmasına katkıda bulunmaktadır [3, 17, 20].

2.4. Literatür çalışmaları

Literatürde hedef dışı canlılar üzerinde permetrin toksisitesi ile ilgili pek çok çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalar yoğunluklu olarak hedef dışı organizmalardan fareler ve sıçanlarla gerçekleştirilmiştir. Bitkiler üzerindeki toksik etkisinin detaylı olarak araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Vadhana ve arkadaşları 34.05 mg/kg permetrin uygulamasının sıçanlarda lipid peroksidasyonunu arttığını ve proteinlerin oksidasyonunu indüklediğini rapor etmişlerdir [34]. Abdullah ve arkadaşları 200 mg/kg permetrin uygulamasının erkek farelerde antioksidan enzimlerden olan KAT aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir [35]. Chargui ve arkadaşları dişi sıçanlarda 0,13 mg/kg permetrin uygulamasının SOD, KAT ve GPx aktivitesini azaltarak antioksidan sistemi zayıflattığını [36], Falcioni ve arkadaşları ise sıçanlarda elektron

transfer sisteminin bir parçası olan kompleks I'ı inhibe ettiğini ve DNA'da tek ve çift zincir kırılmalarına neden olduğunu rapor etmişlerdir [37]. Gabbianelli ve arkadaşları 150 mg/kg permetrin uygulamasının sıçanlarda süperoksit radikal oluşumunu arttırdığını ve H₂O₂-MPO sistemini indüklediğini gözlemlemişlerdir [38]. Yang ve arkadaşları 100-300 µg/L aralığında permetrin uygulaması sonucunda *Danio rerio*'da SOD aktivitesinde herhangi bir değişim olmadığını, permetrin ile birlikte başka bir insektisit uygulanınca SOD ve KAT aktivitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir [39]. Sellami ve arkadaşları 100 µg/L permetrin maruziyetinde *Ruditapes decussatus*'da SOD, KAT ve GST enzim aktivitelerinin arttığını, proteinlerin oksidatif modifikasyona uğradığını ve karbonil protein düzeylerinin önemli derecede yükseldiğini tespit etmişlerdir [23]. Mahmoud ve arkadaşları *Hexaplex trunculus*'da permetrin maruziyetinin KAT aktivitesinde artışa, permetrin maruziyeti dozunun artması ile birlikte KAT aktivitesinde azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir [40]. Literatürde elde edilen bulguların aksine Ross ve arkadaşları 0,1-10,0 µg/L permetrin uygulamasının *P. astreoides* larvalarında KAT aktivitesinde değişime ya da protein oksidasyonuna neden olmadığını rapor etmişlerdir [41]. Permetrin ile ilgili yapılmış literatür çalışmaları ve elde edilen sonuçlar Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Permetrin ile ilgili yapılmış literatür çalışmaları

Uygulama dozu	Organizma	Toksosite	Kaynak
34,05 mg/kg	Wistar sıçan	Lipid peroksidasyonunda ve protein oksidasyonunda artış	Vadhana ve ark.[34]
200 mg/kg	Erkek fare	KAT aktivitesinde artış	Abdullah ve ark. [35]
0,13 mg/kg	Wistar sıçan	SOD, KAT ve GPx aktivitesinde azalma	Chargui ve ark. [36]
150 mg/kg	Wistar sıçan	Kompleks I inhibisyonu DNA'da tek ve çift zincir kırılmaları	Falcioni ve ark. [37]
150 mg/kg	Wistar sıçan	Süperoksit radikal oluşumunda artış	Gabbianelli ve ark. [38]
0,1-10,0 µg/L	<i>Porites astreoides</i>	KAT aktivitesinde değişim Protein oksidasyonu	Ross ve ark. [41]
100-200 µg/L	<i>Hexaplex trunculus</i>	KAT aktivitesinde doza bağlı değişim	Mahmoud ve ark. [40]
100 µg/L	<i>Ruditapes decussatus</i>	SOD, KAT ve GST enzim aktivitelerinde değişim	Sellami ve ark. [23]
100-300 µg/L	<i>Danio rerio</i>	TNFα, iNOS ekspresyonunda artış	Yang ve ark. [39]

Bu çalışmada permetrinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde oluşturduğu toksik etkiler farklı parametreler kullanılarak çok yönlü olarak araştırılmıştır. Literatürde permetrinin hedef dışı organizmlardan olan bitkiler üzerine etkileri detaylı olarak araştırılmamıştır. Bu çalışma ile literatüre permetrinin *A. cepa* gibi indik特 bir organizmadaki etkileri bakımından ilk veri girişı sağlanacaktır. Ayrıca *Zingiber officinale* yumru ekstraktının permetrin toksisitesine karşı azaltıcı etkisi de araştırılmış ve literatüre yeni veri girişı sağlanmıştır.

2.5. *Zingiber officinale* Roscoe

Zingiber officinale, Zingiberaceae familyasına ve *Zingiber* cinsine ait bir türdür ve bir metreye kadar boy alabilen bir bitkidir. *Zingiber officinale* İngiliz botanikçi William Roscoe (1753-1831), tarafından adlandırılmış ve rizomlardaki çıkıntılara atıfta bulunarak "boynuz biçimli" anlamına gelen Sanskritçe bir kelimeden türemiştir. Zingiberaceae 53 cinste ve 1200'den fazla bitki türünden oluşan, özellikle Hint-Malezya'da bol miktarda bulunan tropikal bir gruptur. *Zingiber* cinsi, Doğu Asya ve tropikal Avustralya'dan yaklaşık 85 tür aromatik bitki çeşidi içermektedir [42, 43]. *Zingiber officinale*'ye ait bilimsel sınıflandırma Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3 *Zingiber officinale*'ye ait bilimsel sınıflandırma

Alem:	Plantae
Sınıf	Angiosperms
Takım:	Zingiberales
Familya:	Zingiberaceae
Cins:	<i>Zingiber</i>
Tür:	<i>Zingiber officinale</i>

Çok yıllık bir bitki olan *Z. officinale*'de gövde, iki sıralı yaprakların kılıf tabanları ile çevrilidir. Sarı-mor renk aralığında sopa benzeri bir başağa sahiptir ve başağın alt kısımları gösterişli yeşilimsi sarı ayraçlara sahiptir. *Z. officinale* olgunlaştığında kurumaya başlayan kümeler halinde birkaç yanal sürgün geliştirir. Yapraklar uzun ve 2-3 cm genişliğinde olup, tabanları kılıflıdır. Rizomları kalın başparmak benzeri

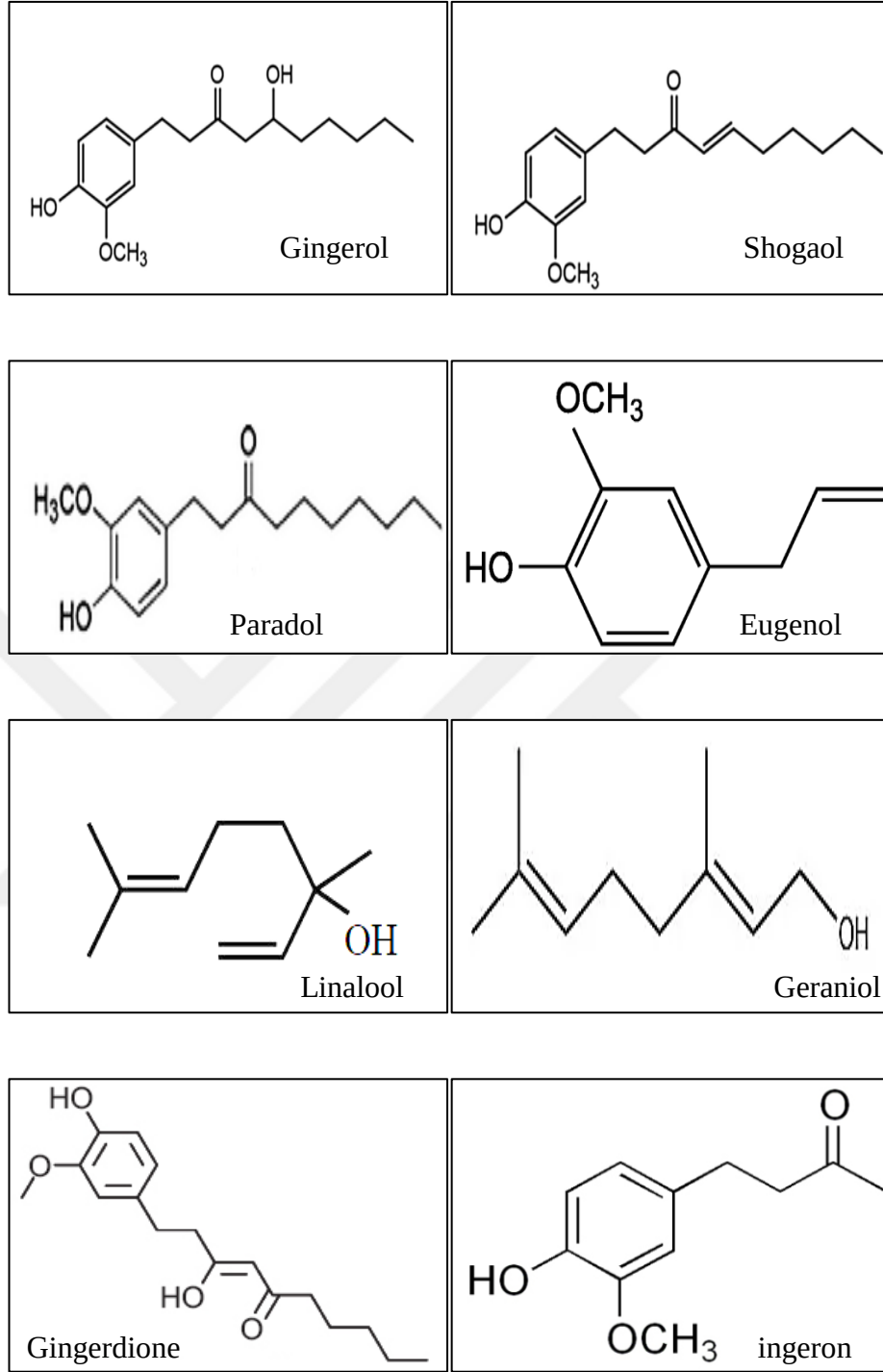
çıkıntılarla dallanır ve bu nedenle rizomun bireysel alt bölümleri de mevcuttur [42, 44]. Rizomlar 7-15 cm uzunluğunda ve 1-1,5 cm genişliğinde ve yanal olarak sıkıştırılmıştır (Şekil 2.4). Rizomun dış yüzeyi devetüyü renkli ve uzunlamasına çizgili veya liflidir [45]. Güney Asya'da doğal olarak yetişmektedir ve günümüzde Çin, Hindistan, Nijerya, Avustralya, Jamaika ve Haiti'de kültürü de yapılmaktadır. Bu ülkelerden Çin ve Hindistan dünya üretiminin büyük bir kısmını sağlamaktadır. *Z. officinale* yumruları aktif özellikleri nedeniyle baharat olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.4. *Z. officinale*'ye ait yaprak, çiçek ve yumru [46-48]

2.5.1. *Zingiber officinale*'nin fitokimyasal içeriği ve biyolojik etkileri

Zencefilin keskin tadı, homolog fenollerden oluşan fenilalanin, malonat ve heksonat içeren yağlı bir sıvı olan gingerol'den kaynaklanmaktadır [45]. Taze zencefil rizomunda gingerol [5-hidroksi-1-(4-hidroksi-3-metoksi fenil) dekan-3-on] ana aktif bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Toz haline getirilmiş rizom %3-6 lipid, %9 protein, %60-70 karbonhidrat, %3-8 ham lif, yaklaşık %8 kül, %9-12 su ve %2-3 uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağlar esas olarak mono ve seskiterpenler içermektedir ve rizom içeriğindeki uçucu yağlar camphene, beta-phellandrene, curcumene, cineole, gerany asetat, terphineol, borneol, geraniol, limonene, linalool, alpha-zingiberene, beta-sesquiphellandrene, beta-bisabolene ve alfa-farnesin olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.5). Bu uçucu yağlardan alpha-zingiberene (%30-70), beta-sesquiphellandrene (%15-20) ve beta-bisabolene (%10-15) majör oranda bulunmaktadır [43]. Kurutulmuş zencefil tozunda, keskin bir bileşen olan ve zencefilolün dehidrate bir formu olarak tanımlanan shogaol bulunmaktadır.



Şekil 2.5. *Z. officinale* ekstraktında bulunan bazı aktif bileşikler

Toz zencefil % 5-8 oranında asit reçineli maddeler de içermektedir [49]. Rizomların diğer keskin bileşikleri paradollar, gingerdioller, gingerdiasetatlar, gingerdionlar, gingersülfonik asit, gingerenonlardır. *Z. officinale* rizomları ayrıca diterpen,

glikolipit A, B ve C türlerini de içermektedir. Amadaldehit, zencefil özünden izole edilmiş yeni bir bileşiktir [43]. Zencefilde bulunan mineraller demir, kalsiyum ve fosfordur. Ayrıca tiamin, riboflavin, niasin ve C vitamini gibi vitaminler içermektedir. Bileşimi, çeşidine, agronomik koşullarına, kür yöntemlerine, kurutma ve saklama koşullarına göre değişmektedir [50]. *Z. officinale* içerdiği zengin fitokimyasallar sayesinde çok farklı biyolojik ve farmakolojik özellikler sergilemektedir. Antik çağlardan beri soğuk algınlığı, öksürük, çeşitli enfeksiyonlar, ateş, astım, bronşit, iştahsızlık, artrit, romatizma, ödem, ağrı, kramp, bulantı, kusma, şişkinlik, gastrit, peptik ülser, bağırsak parazitleri, basur, kabızlık ve diğer bazı sindirim sorunları, hipertansiyon, bunama, dismenore, inme, diyabet ve çeşitli sinir sistemi rahatsızlıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca balgam söktürücü, diüretik, afrodizyak, gaz giderici, tonik, antispazmotik, diaforetik, periferik dolaşım stimülanı, antiinflamatuvar ve sakinleştirici olarak kullanıldığı da bilinmektedir [42, 44]. *Z. officinale* antiartrit, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antibakteriyel, antifungal ve antikanser gibi biyolojik aktivite içeren fitokimyasal içeriklere sahiptir [43]. Zencefilin antiseptik, sindirimi düzenleyici, solunum yollarını açıcı ve toksin atıcı etkileri bilinmektedir. Ayrıca trombosit agregasyonunu da engellemektedir. Anti-oksidatif özelliklere sahiptir ve polifenolik bir bileşik olan yüksek gingerol içeriğinden dolayı süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerini temizleme etkisi de bulunmaktadır. Türkiye florasında bulunmayan ancak süs bitkisi olarak yetiştirilen zencefil, tedavide kullanılmak üzere kültürü yapıldığı ülkelerden ithal edilmektedir. Değişik ülkelerden ithal edilerek piyasaya sürülen zencefil rizomlarının kalitesi bilinmemekle birlikte, konu üzerinde yapılan bir araştırmaya da rastlanılmamıştır [42, 43].

Z. officinale içeriğindeki uçucu yağlar antibakteriyel ve antifungal etkinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bitkinin yetiştiği ortam, iklim şartları, stres faktörleri bitki içeriğindeki uçucu yağların türünde ve oranında değişikliğe neden olmaktadır. *Z. officinale* öjenol, shogaol, zingeron, gingerdiol, gingerol gibi uçucu yağlar içermektedir ve antimikrobiyal etkinin bu bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İçerikte bulunan monoterpen ve seskiterpenler mikroorganizmaların plazma zarının geçirgenliğini ve akışkanlığını değiştirerek sidal

etkiye neden olmaktadır. Monoterpen ve seskiterpenlerin hidrokarbon iskeletinin lipofilik karakteri ve bazı fonksiyonel gruplarının hidrofilik karakteri bu sidal etkinin oluşmasını sağlamaktadır [51, 52]. Antibakteriyel aktivitede gram pozitif ve gram negatif türler üzerindeki etkide bir seçicilik olduğu rapor edilmektedir. *Z. officinale* Gram pozitif suşlar üzerinde gram negatiflere kıyasla daha etkilidir. Bu sonuç sitoplazmik zarı çevreleyen kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşan hücre duvarının uçucu yağın mikrobiyal hedefi olması ile ilişkilendirilmektedir [53]. *Z. officinale* içeriğindeki esansiyel yağlar ve ginger bileşenleri *Fusarium*, *Candida*, *Aspergillus* gibi funguslar üzerinde de etki göstererek antifungal etkinin oluşmasını sağlamaktadır [52, 53].

2.5.2. Literatür çalışmaları

Z. officinale ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar genellikle iki başlık altında yürütülmüştür. Birinci grup çalışmalar genellikle *Z. officinale*'nin fitokimyasal içeriğinin ve biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmalardır. İkinci grup çalışmalar ise *Z. officinale*'nin çeşitli toksik etkilere karşı koruyucu rolünün araştırıldığı çalışmalardır. Bu çalışmada permetrin toksisitesine karşı *Z. officinale* rizom ekstraktının koruyucu özelliği araştırılmıştır. Literatürde permetrin toksisitesine karşı zencefilin koruyucu özelliği ile ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte çeşitli kimyasal ajanlar tarafından indüklenmiş toksisiteye karşı *Z. officinale*'nin koruyucu özelliğinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur.

Kabuto ve arkadaşları *Z. officinale* içeriğinde bulunan zingeronun O_2^- ve OH radikallerini nötralize ettiğini ve lipid peroksidasyonunu baskıladığını bildirmişlerdir [54]. Ghasemzadeh ve arkadaşları *Z. officinale* yaprak ve yumru ekstraktının yüksek oranda fenolik madde içerdiğini ve bu maddelerle antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir [55]. Sakr ve arkadaşları permetrin gibi bir piretroid insektisit olan deltametrin toksisitesine karşı *Z. officinale*'nin etkisini araştırmışlar ve sıçanlarda histolojik değişimlere karşı *Z. officinale*'nin iyileştirici etkiye sahip olduğunu, bu etkinin antioksidan özellikten kaynaklandığını rapor etmişlerdir [56]. Sharma ve arkadaşları dichlorvos ve lindane maruziyeti

sonucunda oluşan oksidatif stresin *Z. officinale* varlığında azaldığını, bu iyileştirici etkinin *Z. officinale*'nin GSH, KAT, SOD, GPx, GST, GR aktivitelerini artırması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [57]. Ahmed ve arkadaşları malathion uygulaması ile indüklenen lipid peroksidasyonunun *Z. officinale* uygulaması ile gerilediğini gözlemlemişlerdir [58]. Literatürdeki çalışmalarda *Z. officinale*'nin koruyucu özelliği in vivo ve in vitro olarak çeşitli toksisite test sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada permetrin toksisitesi ve *Z. officinale*'nin koruyucu rolü *Allium* testi ile araştırılmıştır.

2.6. *Allium* testi

Allium cepa testi çevre kirliliğın biyoindikatörü olarak birçok araştırmacı tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çevre kirliliği yanında tıbbi bitkilerin genotoksik potansiyelini ya da toksisite azaltıcı özelliklerini değerlendirmek için de kullanılan hassas bir testtir. *Allium* testi ile ökaryotlarda DNA'da hasara neden olan maddeler tespit edilebilmekte ve elde edilen sonuçlar tüm hayvan ve bitki biyoçeşitliliğinde ön değerlendirme olarak kullanılabilir. *Allium* testi ilk kez Levan tarafından [59] 1938 yılında mitotik bozulmaların tespitinde kullanılmıştır. İleri yıllarda Fiskesjö, *Allium* testi ile çeşitli kimyasal ajanlar tarafından indüklenen genotoksitenin değerlendirilmesinde oldukça kullanışlı olduğunu belirtmiş ve testte kullanılan *Allium cepa*'nın hidrokarbonları metabolize eden bir oksidaz-enzim sistemine sahip olduğunu rapor etmiştir [60]. Bu sistem memelilerdeki detoksifiye edici mekanizmalarla benzer aktivite sergilemektedir. Bu benzerlik *Allium* testi ile memelilerde gerçekleştirilen toksisite testlerinin yüksek korelasyon sergilemesini sağlamaktadır. Rank ve Nielson, kimyasal ajanların indüklediği toksisite çalışmalarında *Allium* testi ve kemirgenler üzerine yapılan test sonuçlarının %82 korelasyon sağladığını rapor etmiştir [61]. Vicentini ve arkadaşları genotoksik ve sitotoksik etkilerin belirlenmesinde *Allium* testinin oldukça güvenilir ve kullanışlı olduğu belirtmişlerdir [62]. *Allium* testi çeşitli doğal ya da sentetik bileşenlerin sadece sitolojik ya da genetik etkilerinin değil aynı zamanda fizyolojik, klastojenik, aneugenik, anatomik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılmasına da olanak sağlamaktadır. Vasküler bir bitki olan *A. cepa* hızlı büyüme ve kök uzaması

sayesinde pek çok analize imkân sağlamaktadır. Çimlenme ya da kök büyümesindeki inhibisyonlar ve gecikmeler sub-letal dozlar hakkında bilgi sağlamaktadır. Yüksek bölünme kapasitesine sahip *A. cepa* meristematik hücrelerinde mitotik hücrelerin tespiti ile mitotik indeks oranlarının belirlenerek test maddelerin bölünme geciktirici ya da hızlandırıcı etkilerinin tespiti de yapılabilmektedir. *A. cepa* meristem hücrelerinde mitotik indeks oranları toksik etkiden önemli derecede etkilenmekte ve test maddelerinin toksik etkilerinin belirlenmesinde güvenilir sonuçlar elde edilmektedir [59, 61]. Hücre döngüsündeki bölünen hücrelerin toplam sayısı ile karakterize edilen mitotik indeks, çeşitli ajanların sitotoksitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal maddelerin sitotoksikite seviyeleri, MI'daki artış veya azalma ile belirlenebilmektedir [63]. Hoshina negatif kontrolden önemli ölçüde düşük MI'ların uygulanan kimyasalın organizmaların büyümesi ve gelişmesi üzerindeki olumsuz etkilerinden kaynaklandığını belirtmiştir [65]. Negatif kontrolden daha yüksek MI'ların ise hücre bölünmesindeki artıştan ve düzensiz hücre proliferasyonundan kaynaklandığını, bu artışın tümör dokularının oluşumuna yol açabileceğini ifade etmiştir. MI'da gözlenen artış ya da azalmalar özellikle toksik ve sitotoksik potansiyel arz eden kirleticilerin değerlendirilmesinde ve çevre kirliliğinin izlenmesinde önemli göstergelerdir [63]. Smaka-Kincl ve arkadaşları, *A. cepa* meristematik hücrelerinin MI'sindeki azalmanın, ortamdaki sitotoksik ajanların varlığını belirlemede güvenilir bir yöntem olarak kabul edilebileceğini rapor etmiştir [66]. *Allium* testinde genotoksik etkinin belirlenmesinde MI ile birlikte kromozomal anormalliklerin (KA) frekansları da kullanılmaktadır. Kromozomal anormallikler, hem kendiliğinden hem de fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilen kromozomal yapıdaki veya toplam kromozom sayısındaki değişikliklerle karakterize edilmektedir. Yapısal kromozomal değişiklikler, DNA kırılmaları, DNA sentezinin inhibisyonu ve değiştirilmiş DNA'nın replikasyonu gibi çeşitli anormallikler sonucunda oluşmaktadır. Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozomal anormallikler ise ya kendiliğinden ya da anöjenik ajanların etkisi ile ortaya çıkabilen anormal kromozom segregasyonunun sonuçlarıdır [67]. *Allium* testi ile kromozom anormalliklerini değerlendirmek için

hücre bölünmesinin farklı evrelerinde çeşitli kromozomal anormallik türleri incelenmektedir.

KA dışında nükleer anormallikler (NA) de test edilen maddenin genotoksik etkilerinin tespitinde kullanılmaktadır. NA, test edilen ajanın etkisinin bir sonucu olarak interfazik çekirdeklerdeki morfolojik değişiklikler ile karakterize edilmektedir. Genel olarak, bu değişiklikler *Allium* testinde lobüle çekirdekler, nükleer tomurcuk taşıyan çekirdekler, polinükleer hücreler ve mini hücreler olarak gözlenmektedir [63]. KA ile birlikte NA değerlendirmesinin, toksik etkinin mekanizmasının aydınlatılmasında önemi oldukça yüksektir. Leme ve arkadaşları *A. cepa* köklerinin F1 hücrelerinde gözlenmeyen lobüle çekirdeklerin ve polinükleer hücrelerin mevcudiyetinin bir hücre ölüm sürecine işaret ettiğini belirtmiştir [64]. Benzer şekilde Fernandes ve arkadaşları poliploidizasyon sürecinden türetilen aşırı genetik materyalin ortadan kaldırılmasının bir sonucu olarak nükleer tomurcukların ortaya çıkabileceğini göstermiştir [68]. *Allium* testi ile genotoksik etkinin belirlenmesinde mikronukleus (MN) sıklığının analizi de sıkça kullanılmaktadır. MN, kimyasalların teşvik ettiği mutajenik etkiyi analiz etmek için kullanılan en etkili ve en basit analiz yöntemi olarak kabul edilmektedir. MN, ebeveyn hücrelerde yanlış onarılmış veya onarılmamış hasarlardan kaynaklanmakta ve yavru hücrelerde ana çekirdeğe benzer bir yapı olarak, daha küçük bir boyutta kolayca gözlenmektedir. MN, sıklıkla kromozom kırılmaları ve kayıpları gibi bazı KA'ların oluşumundan köken almaktadır. *Allium* testinde MN analizi bu türün hem meristematik hem de F₁ kök hücrelerinde yapılabilmektedir [63]. MN analizi, mutajenik etkilerin değerlendirilmesinin yanı sıra kimyasal ajanların etki mekanizmalarının araştırılmasını da sağlamaktadır. Leme ve arkadaşları MN boyutunun klastojenik ve anöjenik etkileri değerlendirmek için kullanılan etkili bir parametre olduğunu rapor etmişlerdir [64]. Büyük boyutlu MN, kromozom kaybından kaynaklanan anöjenik bir etkiyi gösterirken, küçük boyutlu MN, kromozom kırılmasından kaynaklanan klastojenik bir etkiye işaret etmektedir [63].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Zingiber officinale* ekstraksiyonu

Z. officinale yumruları laboratuvar ortamında steril koşullar altında kurutulmuş, öğütüldükten sonra 0,2 g örnek 10 mL metanol içerisinde çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, katı partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla ekstrakt, filtre edilmiş ve elde edilen filtrat 10 dakika süre ile 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında, sıvı faz evaporatör yardımı ile uçurulmuş ve elde edilen *Z. officinale* ekstraktı (Zoex) ileri analizlerde kullanılmıştır.

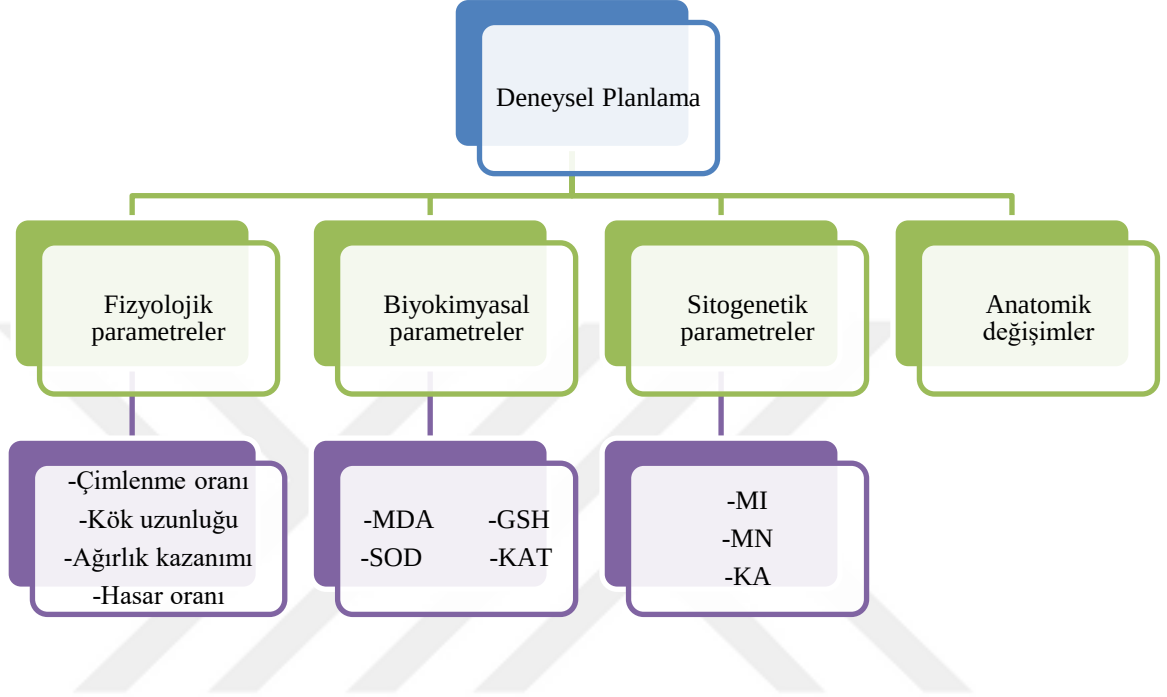
3.2. Deneysel grupların oluşturulması

Permetrin toksisitesi ve Zoex’in koruyucu rolü *Allium* testi ile incelenmiştir. *Allium* testinde test materyali olarak eşit büyüklükteki *A. cepa* bulbları kullanılmıştır. Permetrin toksisitesi ve Zoex’in koruyucu rolünün belirlenmesi amacıyla 6 farklı grup oluşturulmuştur.

Kontrol grubu Grup I olarak kodlanmış ve çeşme suyu ile muamele edilmiştir. Grup II ve Grup III sırasıyla 10µg/mL Zoex ve 20µg/mL Zoex ile muamele edilmiş ve bu gruplarda Zoex’in tek başına toksik etkisinin olup olmadığı test edilmiştir. Grup IV’e ait bulblar 100 µg/L permetrine maruz bırakılmıştır. Zoex’in permetrin toksisitesine karşı koruyucu özelliği doza bağlı olarak araştırılmış ve bu amaçla oluşturulan Grup V ve Grup VI sırasıyla 10µg/mL Zoex+100 µg/L permetrin ve 20µg/mL Zoex+100 µg/L permetrin ile çimlendirilmiştir. Her bir grup için 10 bulb çimlendirilmiş ve çimlendirme 72 saat süre ile 24 °C’de gerçekleştirilmiştir.

3.3. Deneysel planlama

Permetrin toksisitesi ve Zoex'in koruyucu rolünün belirlenmesi amacıyla farklı parametreler kullanılmış ve deneysel planlama Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Deneysel planlama

3.4. Fizyolojik parametreler

Zoex ve permetrinin fizyolojik süreç üzerindeki etkisi kök uzunluğu, ağırlık kazanımı, çimlenme yüzdesi ve hasar oranı parametreleri kullanılarak belirlenmiştir. Bulblara ait kök uzaması radikula oluşumu esas alınarak belirlenmiş, ağırlık kazanımı ise bulbların başlangıç ve son ağırlıkları arasındaki fark alınarak hesaplanmıştır. Çimlenme yüzdesi ve hasar oranı ise sırasıyla Eşitlik 1 ve Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Çimlenme yüzdesi (ÇY)(%): $\text{Çimlenen bulb sayısı} / \text{Toplam bulb sayısı} \times 100$ [1]

Hasar oranı = $[\text{kontrol \%ÇY} - \text{uygulama grubuna ait \%ÇY}] / [\text{kontrol \%ÇY}]$ [2]

3.5. Sitogenetik parametreler

Zoex ve permetrinin sitogenetik parametreler üzerindeki etkileri mitotik indeks, kromozomal anormallikler ve mikronukleus sıklıkları araştırılarak belirlenmiştir. Çimlenme süresi sonunda kök uçları fiksasyon ve hidroliz aşamalarına tabii tutulmuş ve sabit preparatlar hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak her bir gruba ait bulblardan yaklaşık 1-2 cm uzunluğunda kök uçları elde edilmiş, 2 saat süre ile Clarke fiksatöründe bekletilmiş ve süre sonunda kök uçları %96'lık etanol'de 15 dakika yıkanmıştır. Daimi preparasyon için kök uçları hidroliz edilmiş ve bu amaçla 60 °C'de 17 dakika 1N HCl'de bekletilmiştir. Hidroliz sonrasında örnekler asetokarmin ile 24 saat süre boyunca boyanmış, süre sonunda örnekler kanada balzamu kullanılarak sabit preparat haline getirilmiş ve mikroskopta incelenmiştir [69]. Mikronukleus ve kromozomal anormallik sıklığı için her bir uygulama grubunda toplam 1000 hücre sayılmış ve anormallikler mikroskop altında belirlenerek X500 büyütmede fotoğraflandırılmıştır. Mitotik indeks için her bir gruptan toplam 10.000 hücre sayılmış, profaz, metafaz, anafaz ve telofazdaki hücreler bölünen hücre olarak kabul edilmiştir [70]. MI, Eşitlik 3 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Mitotik İndeks (MI)} = \frac{\text{Bölünen hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad [3]$$

3.6. Antioksidan/oksidan dinamik

Permetrin ve Zoex uygulamasının biyokimyasal olarak etkileri antioksidan ve oksidan dengedeki değişimler araştırılarak belirlenmiştir. Bu amaçla antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz ve katalaz, antioksidan molekül olan glutatyon ve oksidan molekül olan malondialdehit ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analizlerden önce kök dokuları ekstrakte edilmiştir. KAT ve SOD ölçümü için kök ucu örnekleri fosfat tamponunda homojenize edilmiş ve santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatant enzim analizlerinde kullanılmıştır. SOD aktivitesi için 1,5 mL 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,3 mL 130 mM metionin, 0,3 mL 750 µM nitroblue tetrazolium klorür, 0,3 mL 0,1 mM EDTA-Na₂, 0,3 mL 20 µM riboflavin, 0,01 mL enzim ekstraktı, 0,01mL %4 (w/v) çözünmez polivinilpirolidon ve 0,28 mL deiyonize su içeren karışım hazırlanmıştır. Reaksiyon 10 dk süresince 2 adet 15 W

floresan lamba altına tüplerin yerleştirilmesiyle başlatılmış ve 10 dakika süresince tüplerin karanlıkta bekletilmesiyle sonlandırılmış ve 560 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır [71]. Katalaz aktivitesi Beers ve Sizer'in metoduna göre analiz edilmiştir [72]. KAT aktivitesi, kullanımdan hemen önce hazırlanan 0.3 mL 0,1M H₂O₂, 1,0mL deiyonize su ve 1,5 mL 200 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,8) içeren 2,8 mL reaksiyon karışımında, 25°C'de UV-VIS Spektrofotometrisi (UV-2550, Shimadzu, Japonya) yardımıyla ölçülmüştür. Reaksiyon, 0,2 mL enzim ekstraktı ilave edilerek başlatılmıştır. KAT aktivitesi H₂O₂ tüketiminin bir sonucu olarak, 240 nm'de absorbanstaki azalma izlenerek ölçülmüştür. MDA ölçümü Ünyayar ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemine göre yapılmıştır [73]. Uygulama süresi sonunda kök uçlarından alınan yaklaşık 0,5 g örnek, %5'lik trikloroasetik asit içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizatlar sıcaklığında 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş, elde edilen süpernatant ve %5'lik tiyobarbitürik asit ile eşit hacimlerde karıştırılarak 96 °C'de 25 dakika kaynatılmıştır. Süre sonunda, karışım soğutulmuş ve 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant absorbansı 532nm'de ölçülmüş ve MDA içeriği $155M^{-1}cm^{-1}$ ekstinksiyon (sönümlleme) katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır. MDA içeriğinin değerleri üç bağımsız örnekleme ölçümlerinden alınmış ve ortalama standart hata (SD) olarak belirtilmiştir. Glutatyon analizi için kök ekstraktı ve aynı hacimde %10'luk trikloroasetik asit 10-15 dakika süreyle buz içerisinde çalkalanmış ve 5000 rpm de 15 dakika santrifüjlenmiştir. 0,4 mL süpernatant, 0,8 mL 0,4M Tris tamponu (pH8,9), 0,02 mL, 10mM DTNB çözeltisi eklenmiş ve 5 dk.'lık bekleme sonrasında absorbans 412 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Örneklerdeki GSH düzeyi kalibrasyon denklemi yardımıyla hesaplanmıştır [74].

3.7. Zoex'in koruyucu özelliği

Test edilen tüm parametrelerde Zoex'in koruyucu özelliği daha yüksek korumanın gözlendiği Grup VI'da elde edilen verilere göre hesaplanmıştır. Hesaplama permetrin+20 µg/mL Zoex uygulanan grubuna ait veriler, permetrin uygulama grubuna ait veriler ve kontrol grubuna ait veriler esas alınmıştır. Zoex'in koruyucu özelliği aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Koruyucu etki (\%)} = [(D_1 - D_2) / (D_3 - D_2)] \times 100 \quad [4]$$

D₁: permetrin+20 µg/mL Zoex uygulanan grubuna ait veri, D₂: permetrin uygulama grubuna ait veri, D₃: kontrol grubuna ait veri

3.8. Anatomik incelemeler

Her bir gruba ait bulbların kök anatomileri kökten enine kesitler alınarak incelenmiştir. Kesitler Metilen Mavisi (%20) ile boyanmış ve entallen ile kapatılarak sabit hale getirilmiştir. Nikon Eclipse Ci-L araştırma mikroskobu ile her bir gruba ait kök kesitleri incelenmiş ve anormallik sıklıkları tespit edilmiştir [70].

3.9. Moleküler doking

Permetrinin etki mekanizmasını aydınlatmak için makromoleküller ile moleküler doking çalışmaları yapılmıştır. Özellikle genotoksik etki mekanizmasını belirlemek için DNA, histon proteinleri ve tubulin proteinlerinin permetrin ile etkileşimi araştırılmıştır. Proteinlerin 3 boyutlu kristal yapısı, protein veri bankasından temin edilmiştir. Permetrinin (PubChem CID: 370) ve fitolün (PubChem CID: 5280435) 3D yapıları PubChem'den alınmıştır. Moleküler doking için Biovia Discovery Studio 2020 Client kullanılmıştır. Proteinler için Swiss-Pdb Viewer20 (v.4.1.0) yazılımı kullanılarak Gromos 43B1 ile enerji minimizasyonu, Open Babel v.2.4.0 yazılımı 21 kullanılarak uff-force alanı ile ligand enerji minimizasyonu yapılmıştır [75, 76].

3.10. İstatiksel analiz

İstatiksel analizler “IBM SPSS Statistics 22” paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verileri ortalama ± SD (standart sapma) şeklinde gösterilmiştir. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem One-way ANOVA ve Duncan testi ile belirlenmiş, p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada permetrin insektisitinin hedef dışı organizma olan *A.cepa* üzerindeki toksik etkileri ve bu etkilere karşı Zoex'in koruyucu özelliği araştırılmıştır. Permetrin ve Zoex'in etkileri fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik parametrelerle incelenmiştir. Permetrin toksisitesi genel olarak hücrelerde yarattığı oksidatif hasar ile, Zoex'in koruyucu özelliği ise içerdiği aktif bileşenlerin etkisi ile ilişkilendirilmiştir.

4.1. Fizyolojik parametreler

Permetrin ve Zoex uygulamalarının *A.cepa*'da fizyolojik parametreler üzerine etkisi Tablo 4.1'de verilmiştir. Kontrol grubu ve tek başına Zoex uygulanan Grup I, II ve III'te çimlenme yüzdesi, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımı açısından istatistiksel olarak farklılıklar gözlenmemiştir. Bu gruplara ait herhangi bir hasar oranı da gözlenmemiştir. Bu durum Zoex'in tek başına çimlenme ile ilgili parametrelerde herhangi bir aksamaya ya da olumsuzluğa neden olmadığını göstermektedir. Permetrin uygulanan grupta çimlenme %65 olarak tespit edilmiş ve kontrol grubuna göre 1,53 kat azalma gözlenmiştir. Kök uzunluğu ve ağırlık kazanımında da benzer olumsuzluklara rastlanmış ve kontrol grubuna kıyasla permetrin uygulanan grupta kök uzamasında %68,5, ağırlık kazanımında ise %81,8 azalma tespit edilmiştir. Tüm uygulama grupları arasında en yüksek hasar oranı 0,53 olarak permetrin uygulanan grupta tespit edilmiştir. Permetrinin çimlenme ile ilgili parametrelerde oluşturduğu gecikme ve anormallikler permetrin tarafından indüklenen hücresel toksisite ile açıklanabilir. Permetrinin de dahil olduğu piretroid insektisitler, bitkilerde kök ve gövde sürgünlerinin gelişiminin inhibisyonuna, fotosentetik pigment seviyelerinde değişime neden olarak hedef dışı organizma olan bitkilerde anormalliklere neden

olmaktadır [77]. Permetrine maruz kalan hücrelerde antioksidan sistem dengesinde bozulma, DNA, lipid ve protein gibi makromoleküllerde oksidatif hasar oluşmaktadır [21]. Özellikle DNA’da tek ve çift zincir kırıklıklarının indüklemesi permetrinin hücre bölünmesini de geciktirici etki göstermesine neden olmaktadır. Bununla birlikte permetrin, elektron transfer zinciri sistemindeki komplekslerin inhibisyonuna da neden olmakta ve bu etki fotosentetik süreçlerde aksamaya ve çimlenme sürecinin gecikmesine neden olmaktadır [37]. Permetrinin bu olumsuz etkilerinin kümülatif bir sonucu olarak *A. cepa*’da çimlenme ve gelişme olumsuz yönde etkilenmektedir. Litertürde permetrinin bitkilerde çimlenme üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte piretiroidlerin etkisinin araştırıldığı benzer çalışmalar mevcuttur. Çavuşoğlu ve arkadaşları 1.5-6 ppm dozlarında sipmetrin uygulamasının karotenoid, klorofil a ve b pigment düzeylerini önemli derecede azalttığını, bu azalmanın hücrede oluşan stres ve biyosentez mekanizmalarının inhibisyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir [78].

Permetrin ile birlikte Zoex uygulanan Grup V ve VI’da çimlenme parametrelerinde doza bağlı bir iyileşme olduğu belirlenmiştir. 20 µg/mL Zoex uygulanan Grup VI’da sadece permetrin uygulanan gruba kıyasla kök uzunluğunun %52,1, ağırlık kazanımının ise %76 oranında arttığı tespit edilmiştir. Çimlenme oranları esas alınarak hesaplanan hasar oranı permetrin uygulanan grupta 0,53 iken permetrin ile birlikte 10 µg/mL Zoex uygulanan grupta 2,29’a, 20 µg/mL Zoex uygulanan Grup VI’da ise 0.21’e gerilemiştir. Bu sonuçlar permetrinin çimlenme üzerinde sergilediği toksik etkinin Zoex varlığında gerilediğini, Zoex’in koruyucu bir özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Zoex’in bu koruyucu özelliği içerdiği aktif bileşenler ile permetrin tarafından indüklenen oksidatif hasarın nötralize edilmesi ile açıklanabilir. Zoex’in shogaol, paradol ve gingerol gibi fenolik bileşik, zingiberol, zingiberen, bisapolene gibi terpen, A, C ve E vitaminleri gibi pek çok bileşen içerdiği bilinmektedir [79]. Zoex içeriğinde bulunan gingerol ve shogaol gibi fenolik bileşikler antikanser, anti-inflamatuvar, anti-fungal ve antioksidan gibi pek çok biyolojik özelliğe sahiptir. Bu aktif bileşikler doza bağlı olarak serbest radikal düzeyini azaltıcı ve glutasyon düzeylerini artırıcı etkiye sahiptir. Bu etki hücrelerdeki oksidatif hasarı da nötralize etmektedir [80, 81]. Zoex’in permetrine

karşı sergilediği koruyucu özellik içerdiği aktif bileşenlerin biyolojik aktivitelerinin kümülatif bir sonucudur. Benzer şekilde literatürde Masuda ve arkadaşları Zoex içeriğinde bulunan gingerolün antioksidan özellikte olduğunu rapor etmişlerdir [82]. Morakinyo ve arkadaşları Zoex'in in vitroda serbest radikal temizleyici ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliklerini tespit etmişlerdir [83].

Tablo 4.1. Permetrin ve Zoex'in fizyolojik parametreler üzerine etkisi

Gruplar	Çimlenme Yüzdesi (%)	Kök Uzunluğu (cm)	Ağırlık Kazanımı (g)	Hasar oranı
Grup I	100	7,3±1,5 ^a	6,40 ^a	ND
Grup II	100	7,5±1,7 ^a	6,62 ^a	ND
Grup III	100	7,7±1,8 ^a	6,85 ^a	ND
Grup IV	65	2,3±0,8 ^d	1,16 ^d	0,53
Grup V	71	3,6±1,0 ^c	3,00 ^c	0,29
Grup VI	79	4,8±1,3 ^b	4,85 ^b	0,21

* Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir. Çimlenme yüzdesinin belirlenmesinde 50 adet, kök uzunluğu ve ağırlık kazanımının tespiti için ise 10 adet bulb kullanılmıştır. Aynı sütün içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar p<0.05'de önemlidir. ND: Belirlenemedi.

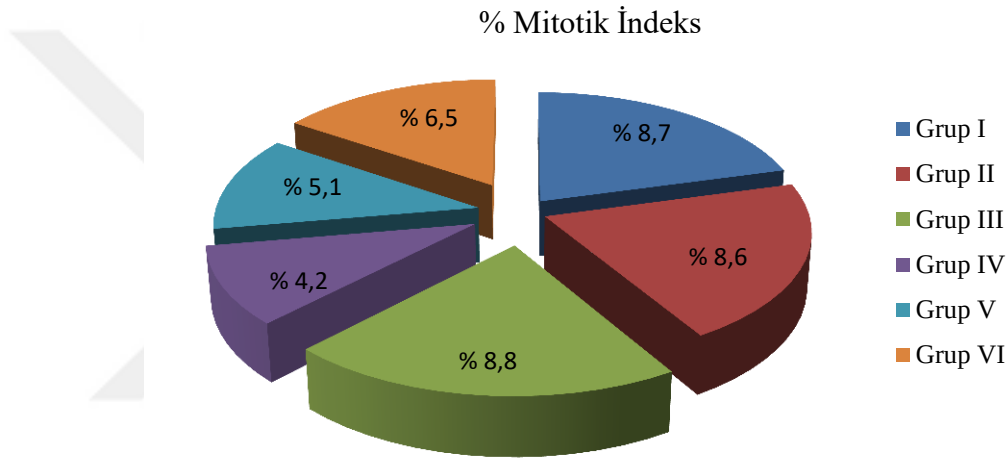
4.2. Sitogenetik parametreler

Permetrin ve Zoex'in *A. cepa*'da sitogenetik etkileri MI oranı ile MN ve CAS sıklıkları araştırılarak belirlenmiştir. MI, hücrelerin bölünme derecelerinin bir göstergesidir. Kontrol ve tek başına Zoex uygulanan gruplarda sayılan 10,000 hücre içerisinde bölünen hücre sayısı 860,48 – 880,90 aralığında bulunmuştur. Bu üç grup arasında MI bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (p>0.05) ve bu durum Zoex'in hücre proliferasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadığını göstermektedir. Permetrin uygulanan grupta MI %51,6 azalarak 420,66'ya gerilemiştir (Şekil 4.1). MI, canlı hücrelerde güvenilir bir sitotoksikite göstergesidir. MI oranlarında gözlenen %50' den düşük azalmalar subletal etkiye, %50' nin üzerindeki azalmalar ise letal etkiye işaret etmektedir [84]. Bu ayrıma göre permetrinin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde letal etki sergileyebileceği görülmüştür. Sitotoksik ajanlar MI oranlarındaki azaltıcı etkiyi mikrotübül oluşumunu inhibe ederek göstermektedir. Multipolar anafaz, c-mitoz ve yapışkan kromozom gibi

kromozomal anormallikler de mikrotübül ve iğ ipliği oluşumunun inhibisyonu ile ilişkilidir [84]. Permetrin uygulaması sonucunda yapışkan kromozom oluşumu da mikrotübül oluşumunun inhibisyonunu desteklemektedir. Permetrin uygulanan grupta MI oranında düşüş ile birlikte yüksek sıklıkta MN oluşumuna da rastlanmıştır. Permetrin uygulanan Grup IV'de sayılan 1000 hücrede içerisinde toplam 72,84 hücrede MN oluşumuna rastlanmıştır (Tablo 4.2). Permetrin uygulanan grupta saptanan yüksek MN sıklığı MI oranındaki düşüşü de desteklemektedir. MI oranındaki düşüşe neden olan iğ ipliği anormallikleri aynı zamanda MN oluşumunda tetikleyicisidir. İğ ipliği anomallikleri MN'lerin erken safhalarda görünümüne, mitozun G₁ safhasındaki anormallikler ise geç safhalarda MN oluşumlarına sebep olmaktadır [85]. Delic, test ettiği 1-12 mg/mL konsantrasyonlarında permetrin uygulamasının hücre kültüründe mitotik indeksi önemli ölçüde azalttığını ve hücre döngüsünü geriletirerek sitostatik etkiler gösterdiğini tespit etmiştir [86]. Roma ve arkadaşları düşük düzeylerde permetrin uygulamasının bile genetik materyalde hasar oluşumunu indüklediğini ve 24 saatlik bir uygulama sonucunda ilk hücre döngüsünde MN oluşumlarının gözlemlendiğini rapor etmişlerdir [87].

Permetrin ile birlikte Zoex uygulanan gruplarda MI ve MN oranlarında gözlenen anormalliklerde gerileme belirlenmiştir. Permetrin ile birlikte 20 µg/mL Zoex uygulamasının Grup IV'e kıyasla MI oranında %38,16 artışa, MN sıklığında ise %52,38 azalmaya neden olmuştur. Bu sonuç Zoex'in permetrinin MI oranındaki azaltıcı etkisine ve MN oluşumundaki indükleyici etkisine karşı koruyucu özelliğini göstermektedir. Permetrin genel olarak hücrelerde oksidatif strese ve makromoleküllerde oksidasyona neden olmaktadır. Permetrinin indüklediği oksidatif hasarın ana hedef moleküllerinden biri proteinlerdir. Permetrin tarafından indüklenen oksidatif stres sonucunda karbonil proteinlerinin oluşumunun arttığı bilinmektedir [23]. Protein yapıda olan iğ iplikleri ve mikrotübüllerin oksidasyonu da bu proteinlerin fonksiyonun inhibisyonuna, mitotik döngünün aksamasına ve MN oluşumlarına yol açmaktadır. Zoex hücreleri bu tür oksidasyonlara karşı koruyarak normal mitotik döngünün devamını sağlamaktadır. Zoex içeriğinde bulunan gingerol ve shagaol gibi fenolik bileşikler oksidatif stresi azaltıcı ve glutatyon gibi

antioksidanların düzeylerini arttırıcı etkiye sahiptir. Bu etki hücrelerdeki oksidatif hasarı da nötralize etmektedir ve iğ ipliği gibi proteinleri ve diğer makromolekülleri de hasardan korumaktadır [80, 81]. Literatürde farklı toksik ajanların indüklediği hasarlara karşı Zoex'in koruyucu özelliği araştırılmış ve bu koruyucu özellik antioksidan aktivite ile ilişkilendirilmiştir. Okesola ve arkadaşları *Z.officinale* yumrularının mikronukleus oluşum sıklığını azalttığını ve MI oranlarında düzelme sağladığını rapor etmişler ve bu koruyucu özelliğin zencefil içeriğindeki fenolik, saponin ve alkaloid gibi aktif bileşenlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir [88].



Şekil 4.1. Permetrin ve Zoex'in *A.cepta*'da MI oranları üzerine etkileri. Her bir grupta her bir kök ucu için 1,000 hücre, toplamda 10,000 hücre sayılmıştır.

Permetrin ve Zoex uygulamaların *A.cepta* kök ucu hücrelerindeki muhtemel genotoksik etkilerini değerlendirmek için kromozomal anormallik testi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Sadece Zoex uygulanan gruplarda kromozomal anormalliğe rastlanmazken, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan yapışkan kromozom oluşumuna rastlanmıştır. Sadece permetrin uygulanan Grup IV'de yüksek oranlarda KA oluşumları tespit edilmiştir. KA oluşumları arasında fragment en yüksek sıklıkta oluşurken bunu sırası ile yapışkan kromozom, vakuollü nukleus, kromatinin eşit olmayan dağılımı, köprü, binükleer hücre ve ters kutuplaşma izlemektedir. Permetrinin yüksek oranda fragment oluşumuna neden olması DNA'da kırık oluşumlarını indüklediğini göstermektedir.

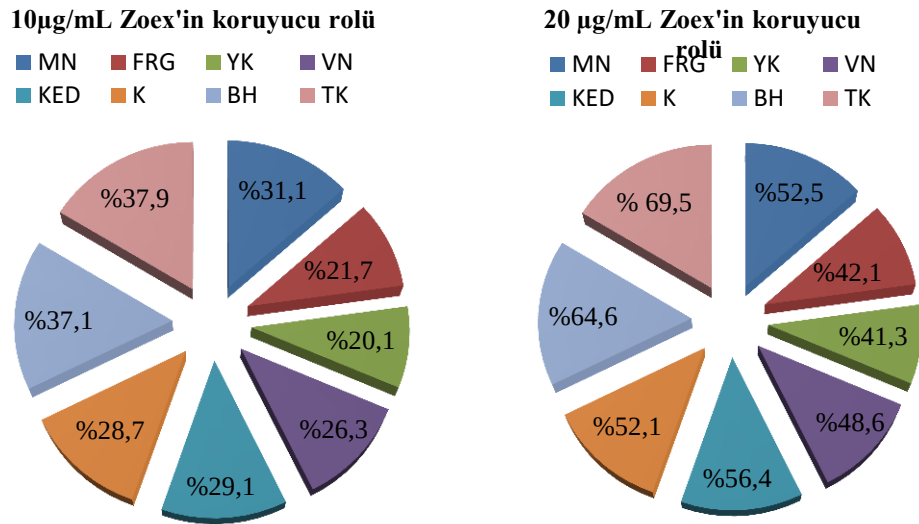
Permetrin hücrelerde oksidatif hasara, DNA’da çift ve tek zincir kırıklıklarına neden olmaktadır [37]. Bu fragment oluşumları hücre bölünmesinin ilerleyen safhalarında MN şekline dönüşmektedir. Permetrin tarafından indüklenen bir diğer anormallik olan yapışkan kromozom artan kromozomal yoğunlaşmadan, DNA’nın depolimerizasyonundan ve nükleoproteinlerin kısmi çözünmesinden kaynaklanmaktadır. Genellikle geri dönüşü olmayan ve muhtemelen hücre ölümüne yol açan yapışkan kromozomlar yüksek toksik etkileri yansıtmaktadır. Permetrin uygulaması sonucunda yüksek sıklıkta tespit edilen vagrant kromozomlar kutuplara çekilen kromozom grubundan ayrı hareket ederek yavru hücrelerde kromozom sayısının eşit olmayan şekilde ayrılmasına yol açmaktadır [89]. Permetrinin farklı tiplerde KA oluşumlarını indüklemesi ve her bir anormalliğin farklı mekanizmalarla oluşması, permetrinin spesifik bir genotoksik etki sergilemediğine, çoklu mekanizmalarla KA oluşumlarını tetiklediğine işaret etmektedir. Literatürde permetrin uygulamasının çeşitli hedef dışı organizmalarda genotoksisiteye neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Falcioni ve arkadaşları sıçanlarda 150 mg/kg permetrin uygulamasının DNA-DNA çapraz bağlanmalarına ve oksidatif strese bağlı DNA hasarlarına neden olduğunu rapor etmiştir [37].

Tablo 4.2. Permetrinin teşvik ettiği genotoksisiteye karşı Zoex’in koruyucu rolü

Hasar	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V	Grup VI
MN	0,24±0,33 ^d	0,16±0,28 ^d	0,12±0,18 ^d	72,84±5,16 ^a	50,24±3,95 ^b	34,68±2,50 ^c
FRG	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	51,36±3,98 ^a	40,20±2,88 ^b	29,78±2,19 ^c
YK	0,10±0,16 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	40,15±2,78 ^a	32,14±2,26 ^b	23,58±1,85 ^c
VN	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	32,72±2,54 ^a	24,11±1,93 ^b	16,80±1,48 ^c
KED	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	24,18±1,86 ^a	17,15±1,50 ^b	10,53±1,32 ^c
K	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	17,91±1,54 ^a	12,76±1,22 ^b	8,58±0,96 ^c
BH	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	13,98±1,40 ^a	8,80±0,98 ^b	4,94±0,66 ^c
TK	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	7,73±0,92 ^a	4,80±0,64 ^b	2,35±0,48 ^c

*Aynı satır içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar p<0.05’de önemlidir. MN: mikronukleus, MI: mitotik indeks, FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, VN: vokuollü nukleus, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, K: köprü, BH: binükleer hücre, TK: ters kutuplaşma

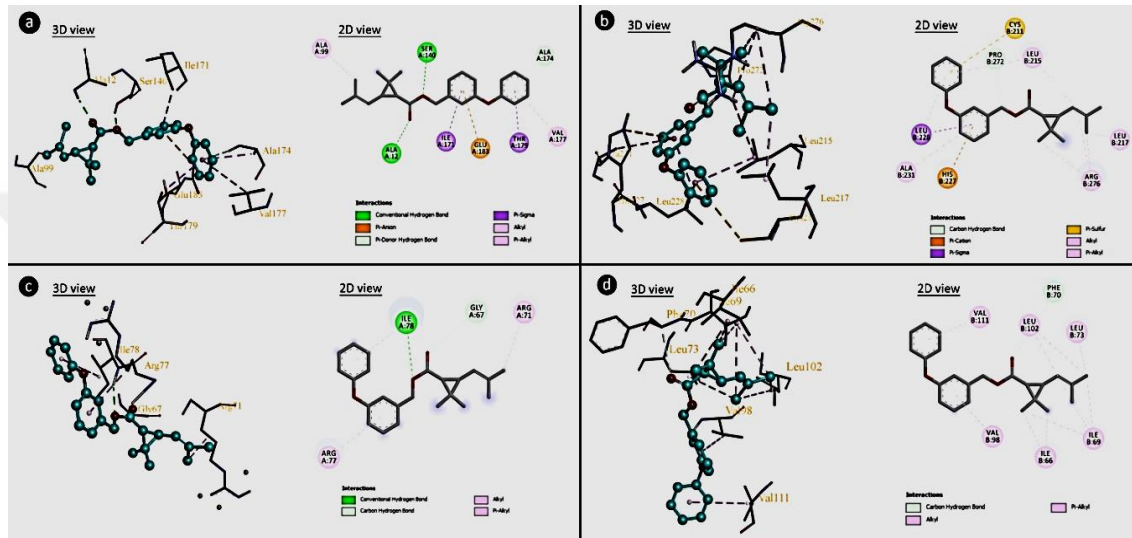
Permetrin ile birlikte Zoex uygulanan gruplarda KA sıklıklarında belirgin azalmaların olduğu saptanmış, en belirgin gerileme ise 20 µg/mL Zoex uygulanan Grup VI'da gözlenmiştir. 10 µg/mL Zoex, permetrin tarafından indüklenen KA oluşumlarına karşı %20,1-%37,9 aralığında; 20 µg/mL Zoex ise %41,3-%69,5 aralığında koruyuculuk sergilemiştir (Şekil 4.2). Test edilen her iki doz için en yüksek koruyuculuk ters kutuplamaya karşı elde edilmiştir. Zoex'in KA oluşumlarına karşı koruyucu özelliği antioksidan aktivitesi ile açıklanabilir. Permetrin DNA oksidasyonuna neden olarak KA oluşumlarını indüklemektedir. Zoex permetrin tarafından indüklenen oksidatif yükü azaltarak DNA hasarlarını önlemekte ve KA oluşumlarına karşı koruma sağlamaktadır. Literatürde Zoex'in permetrin toksisitesine karşı koruyucu özelliğini rapor eden bir çalışma bulunmazken, çeşitli piretroidlere karşı koruyucu özelliğinin saptandığı çalışmalar mevcuttur. Al-Amoudi permetrin gibi bir piretroid insektisit olan lambda-sihalotrinin indüklediği DNA hasarına karşı zencefil ekstraktının koruyucu özellikte olduğunu rapor etmiştir [90].



Şekil 4.2. Zoex uygulamasının MN ve KA oluşumlarına karşı koruyucu rolü

4.3. Permetrinin moleküler doking destekli sitotoksisite ve genotoksisite mekanizması

Permetrinin sitotoksik ve genotoksik etkileri moleküler doking ile aydınlatılmıştır. Sitotoksik etkilerin tubulin-permetrin etkileşimlerinden kaynaklandığı düşünülmüş ve permetrin-tubulin etkileşimi Şekil 4.3.'te verilmiştir.



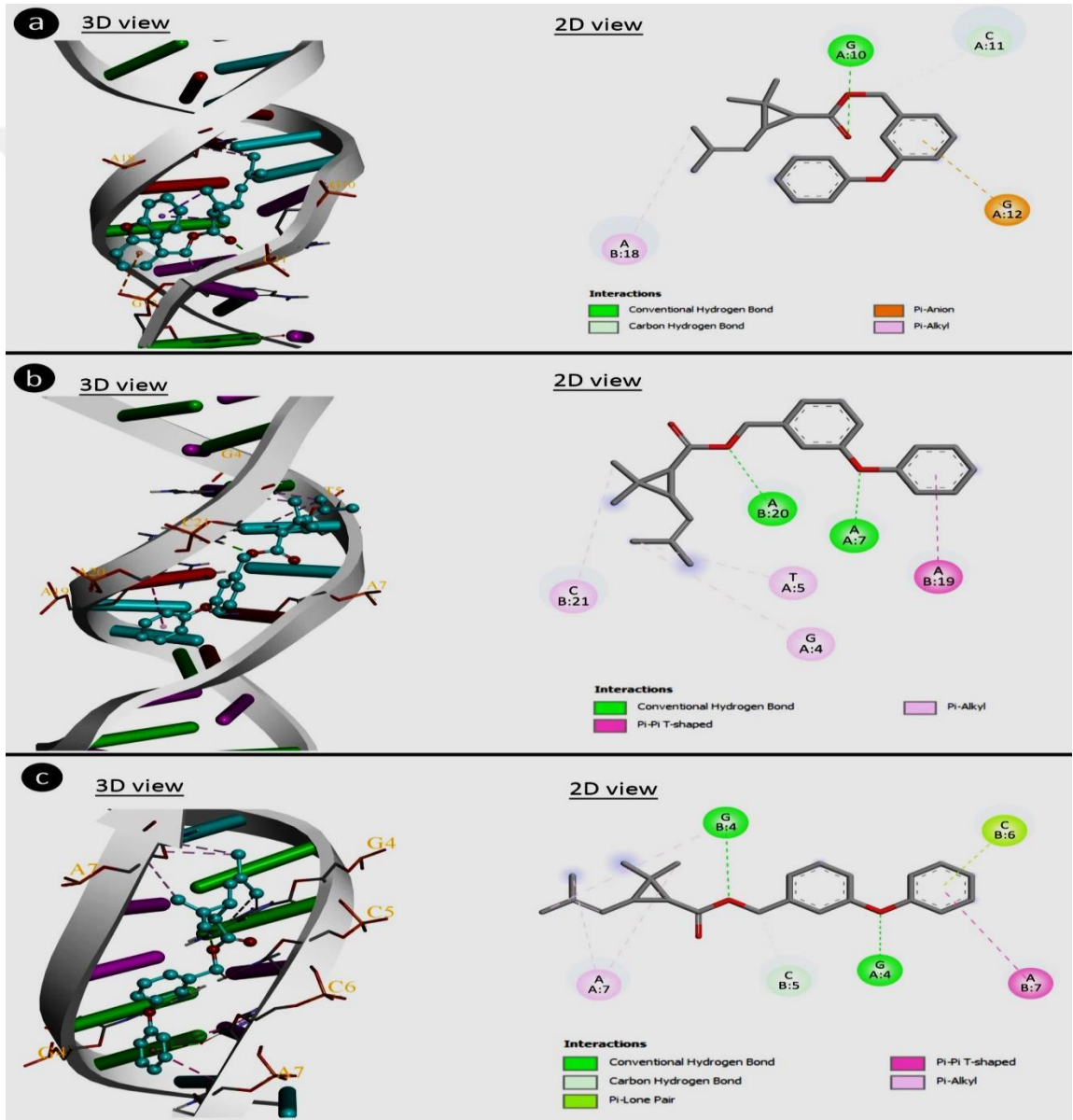
Makromolekül	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Inhibisyon sabiti (Ki)	Hidrojen bağı	Hidrofobik etkileşimler
Alfa tubulin-1B zinciri	-8,72	408,70 nM	ALA12 SER140 ALA174	ILE171,THR179 ALA99,ALA174 VAL177,
Beta tubulin	-7,71	2,24 uM	PRO272	LEU228 (x2),ARG276 (x3),LEU215 (x2) LEU217
Histon H2A.6	-4,30	710,55 uM	ILE78 GLY67	ARG71,ARG77 ILE78
Histon H2B.1	-7.14	5.85 uM	PHE70	ILE66 (x2),ILE69 (x3) LEU73,LEU102 (x2) VAL98,VAL111

Şekil 4.3. Permetrin-tubulin ve permetrin-histon proteinlerinin etkileşimi

Permetrin tubulin-alfa zincirindeki alanin ve serin aminoasitleri ile hidrojen bağı yoluyla etkileşmektedir. Ayrıca zincirdeki lösin ve treonin gibi aminoasitlerle de hidrofobik etkileşimler kurmaktadır. Permetrin, tubulin alfa zinciri için -8,72 kcal/mol bağlanma enerjisine ve 408,70 nM inhibisyon sabitine sahiptir. Benzer şekilde permetrin, tubulin beta zinciri ile de etkileşime girmekte ve bu etkileşimler prolin ile hidrojen bağı, lösin aminoasitleri ile hidrofobik etkileşimler yoluyla gerçekleşmektedir. Alfa ve beta tubulin proteinleri polimerleşerek mikrotübülleri oluşturmaktadır. Mikrotübüller, ökaryotik kromozomları birbirinden ayırmak için kullanılan mitotik iğciklerin ana bileşenleridir ve bu proteinlerdeki anormallikler doğrudan mitoz bölünmede gecikmelere neden olmaktadır. Permetrin, tubulin proteinleri ile etkileşerek üç boyutlu yapılarında bozulmaya neden olmakta, mikrotübül polimerizasyonu gerçekleşmediği için kromozomların kutuplara hareketi kısıtlanmakta ve bu durum hem mitotik safhalarda aksamalara hem de KA oluşumlarına neden olmaktadır. Sipermetrinin *A. cepa*'da MI oralarını azaltarak sergilediği sitotoksik etkinin mekanizması permetrin-tubulin etkileşimlerine dayanmaktadır. Permetrinin sergilediği genotoksik etki ise permetrin-histon (Şekil 4.3) ve permetrin-DNA (Şekil 4.4) etkileşimleri sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Permetrin histon H2A.6 ve Histon H2B.1 proteinleri ile sırasıyla -4,30 ve -7,14 kcal/mol bağlanma enerjisine, 710,55 uM ve 5,85 uM inhibisyon sabitine sahiptir. Permetrin ve histon proteinleri arasında çeşitli aminoasit kalıntıları aracılığıyla hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler gerçekleşmektedir. Permetrin ve histon proteinleri arasındaki bu etkileşimler, DNA-histon bağlanmasını zayıflatmakta, DNA ve kromozom yapısında bozulmaya/çözünmeye neden olmaktadır. Permetrinin çeşitli DNA sekansları ile moleküler doking analizi sonrasında B-DNA'da (1BNA) A zincirinde G10, C11, ve G12 bazları ile, B zincirinde ise A18 bazı ile etkileşime girdiği, bu etkileşimde bağlanma enerjisinin -7,40 kcal/mol olduğu belirlenmiştir. Başka bir DNA sekansında (195D) -10,47 kcal/mol bağlanma enerjisi ile A zincirinde G4, T5 ve A7 bazları ve B zincirinde A19, A20 ve C21 bazları ile etkileşime girdiği saptanmıştır. Permetrin ve 5'-TTGGCCAA-3' sekansının (1CP8) etkileşiminde -8,08 kcal/mol bağlanma enerjisi elde edilmiştir (Tablo 4.3). Permetrin ve farklı DNA sekansları arasındaki moleküler yerleştirme çalışmaları sonucunda

DNA molekülleri ile hem aynı hem de farklı zincirlerle etkileşime giren permetrinin G-C-G, G-T, A-A-C ve G-C-C-A bazlarınca zengin bölgelere bağlanarak DNA'nın yapısını etkileyebileceği belirlenmiştir. Ayrıca permetrinin interkalasyon potansiyelini olduğu saptanmıştır. İnterkalasyon özelliğine sahip ajanlar DNA üzerinde çeşitli ve çoklu biyolojik etkilere sahiptir. DNA ve RNA sentezinde inhibisyon, proteinle ilişkili DNA kırılmaları ve çerçeve kayması mutasyonları bu etkilerden bazılarıdır.



Şekil 4.4. Permetrin-DNA etkileşimi (BNA, b:195D, c:1CP8)

Tablo 4.3. Permetrin-DNA etkileşiminde bağlanma enerjisi ve inhibisyon sabiti

DNA	DNA Sekansı	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)	Inhibisyon sabiti (Ki)	Baz etkileşimi (Zincir: baz)
B-DNA				
Dodecamer (1BNA)	5'-CGCGAATTCGCG-3'	-7,40	3,76 uM	A:G10;A:C11 A:G12;B:A18
B-DNA				A:G4;A:T5
Dodecamer D (195D)	5'-CGCGTTAACGCG-3'	-10,47	21,05 nM	A:A7;B:A19 B:A20;B:C21
DNA (1CP8)	5'-TTGGCCAA-3'	-8,08	1,20 uM	A:G4;A:A7 B:G4;B:C5 B:C6;B:A7

4.4. Antioksidan/oksidan dinamik

Permetrin ve Zoex'in *A. cepa* kök ucu hücrelerinde indüklediği biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi için kök ucu hücrelerinde SOD, KAT, MDA ve GSH düzeyleri incelenmiştir (Tablo 4.4). Bu sayede oksidan ve antioksidan dengede değişimler de incelenmiştir. Antioksidan enzimlerden olan SOD ve KAT aktivitesi kontrol grubu ve sadece Zoex uygulanan grupta benzer düzeylerde tespit edilirken, sadece permetrin uygulanan Grup IV'de enzim aktivitelerinin önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. SOD ve KAT enzimlerinin fonksiyonları düşünüldüğünde, permetrin uygulaması sonucunda bu enzimlerin aktivitesindeki artış hücrede oksitleyici ajanların artışına işaret etmektedir. Tüm aerobik organizmalarda fotosentez ve solunum gibi biyokimyasal yollarda süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve singlet oksijen başta olmak üzere pek çok zararlı reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Hücrelerde artan reaktif oksijen türlerinin üretimi oksidatif strese neden olarak lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonuna, enzim inhibisyonuna, apoptoza ya da hücre ölümüne yol açmaktadır. Aerobik organizmalara ait hücreleri oksidatif hasardan koruyabilmek için çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidan enzimler bu mekanizmalardan biridir [91]. SOD, süperoksit radikalının moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dismutasyonunu

katalize eden bir enzimdir. Süperoksit radikali hücrelerde oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilmekte ve nötralize edilemediği durumlarda hücre hasarına neden olmaktadır. Bu nedenle SOD, aerobik canlılara ait hücrelerde bulunan ve oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir role sahip enzimdir [92]. Ksenobiyotik, yüksek ışık, su stresi ve kuraklık dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak hücrelerde SOD aktivitesi artmaktadır. Bowler ve diğerleri oksidatif hasar bölgesinden nukleusa ulaşabilen lipid peroksidasyon ürünleri tarafından SOD genlerinin transkripsiyonunun indüklendiğini rapor etmektedir [93]. Bu çalışmada da permetrin uygulaması sonucunda artan SOD aktivitesi hücrelerde oluşan oksidatif strese işaret etmektedir. SOD tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksit de oksitleyici bir ajandır ve hücrelerde harabiyete neden olmaktadır. Hidrojen peroksit hücrelerde sadece SOD aktivitesi sonucunda değil aynı zamanda yağ asitlerinin β -oksidasyonu, glioksilat döngüsü (fotorespirasyon) ve pürin katabolizması sonucunda da üretilmektedir [94]. H_2O_2 bitkilerde fruktoz bisfosfataz, sedoheptuloz bisfosfataz ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz gibi enzimlerin -SH gruplarıyla doğrudan reaksiyona girerek inhibisyona neden olmaktadır. Ayrıca metalloproteinlerle reaksiyona girerek metal iyonlarının ayrışmasına ve proteinlerin biyolojik aktivitelerinde kayba neden olmaktadır. KAT hidrojen peroksidin hücrelerden uzaklaştırılmasında önemli bir rol üstlenmektedir [95]. Hücrelerde artan KAT aktivitesi, stres altında bitkilerin hayatta kalması için çok önemlidir ve yüksek şiddetteki stres altında katalaz enziminde geri dönüşümsüz hasar meydana gelmektedir [96]. Bu çalışmada permetrin uygulaması sonrasında artan KAT aktivitesi *Allium cepa*'da oluşan strese ve bu stresle başa çıkabilmek için hücrenin savunma sisteminin indüklendiğine işaret etmektedir. Antioksidan enzimlerden olan SOD ve KAT aktivitesindeki bu artışlar permetrin uygulamasının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde oksidatif strese neden olduğuna işaret etmektedir. Çavuşoğlu ve arkadaşları bir piretroid insektisit olan sipermetrinin düşük dozlarına maruz kalan *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde KAT aktivitesinin indüklediğini, sipermetrin dozunun artışı ile birlikte KAT aktivitesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir [78].

Permetin ve Zoex uygulamasının kök ucu hücrelerinde GSH ve MDA düzeyleri üzerine etkisi de incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. MDA ve GSH

içeriği bakımından Grup I, II ve III'de benzer düzeyler elde edilmiştir. Permetrin uygulanan grupta GSH düzeyinin %44,8 azaldığı, MDA düzeyinin ise %76 oranında arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, permetrinin antioksidan-oksidan dengesini bozduğunu ve özellikle lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. MDA, hücrelerde enzimatik veya enzimatik olmayan işlemler yoluyla araşidonik asit ve daha büyük doymamış yağ asitlerinin parçalanması sonucunda oluşan bir üründür. Hücrelerde düşük düzeylerde MDA enzimatik yollarla üretilmekte ve sinyal transdüksiyonunda ve gen ekspresyonunda görev almaktadır. Enzimatik olmayan yollarla MDA oluşumu genel olarak stres koşulları altında gerçekleşmektedir ve hücrelerde aşırı MDA üretimine neden olmaktadır. MDA yüksek elektrofilik özelliğe sahiptir ve bu özellik MDA'nın lizin, histidin veya arjinin gibi aminoasitlere karşı yüksek reaktivite sergilemesini sağlamaktadır. Bu reaktivite sonucunda MDA protein ve DNA gibi biyomoleküllere bağlanarak hasara neden olmaktadır [97]. MDA proteinlerde ve DNA moleküllerinde inter ve intramoleküler çapraz bağlanmalara neden olarak ciddi değişimlere neden olmaktadır. Pek çok enzimatik proteinler, taşıyıcı proteinler, hücre iskeleti proteinleri, mitokondriyal ve antioksidan proteinler dahil olmak üzere pek çok protein yapıdaki bileşiklerin MDA tarafından modifiye edildiği bilinmektedir. Modifiye edilen ve üç boyutlu yapısı değişen bu proteinlerde fonksiyon kaybı ya da aktivitede azalma görülmekte ve hücresel faaliyetlerde aksama yaşanmaktadır [98]. Permetrinin uygulaması sonucunda *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde MDA düzeyindeki artış oksidatif stres oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. MDA'daki artış protein ve DNA gibi makromoleküllerde de hasarı indüklemekte ve sitogenetik analizlerde gözlenen kromozomal hasarları da doğrulamaktadır.

Permetrin uygulaması sonucunda oluşan oksidatif stres GSH düzeylerinde de anormalliğe neden olmuştur. GSH, yüksek bitkilerin çoğu dokularında, hücrelerinde ve çeşitli organellerde bulunmaktadır. GSH düzeyi bitkinin yaşına, bulunduğu ortama ve stres koşullarına göre değişmektedir. GSH, birçok yönden bir antioksidan olarak işlev görmektedir. Singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kimyasal olarak reaksiyona girerek doğrudan bir serbest radikal temizleyici olarak işlev görmektedir. GSH, lipid peroksidasyon reaksiyonları tarafından oluşturulan

asil peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısını da stabilize etmektedir [99]. GSH'nin antioksidan özelliklerinden bağımsız olarak hücrel metabolizmada alternatif işlevleri de vardır. GSH, Glutatyon-S-transferaz enzimi için bir substrat olarak ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna da görev almaktadır. Bitkilerin pestisitlere karşı geliştirdiği toleransta GSH'nin pestisitlerle konjugasyonu önemli bir reaksiyondur. GSH, bitkilerde bu korumayı sağlarken okside olmakta ve redükte GSH okside GS-SG formuna dönüşmekte ve redükte GSH düzeyleri hızla azalmaktadır [100, 101]. Bu çalışmada permetrin uygulanan grupta GSH düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Bu azalmanın redükte GSH'ın okside GS-SG formuna dönüşmesinin, insektisit konjugasyonunda GSH kullanımının ve serbest radikallerin süpürülmesi sırasında GSH'ın okside olmasının kümülatif bir sonucu olarak oluştuğu düşünülmektedir. Literatürde permetrin uygulamasının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde MDA ve GSH düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamakla birlikte benzer sonuçların elde edildiği araştırmalar mevcuttur. Çavuşoğlu ve arkadaşları permetrin gibi bir pestisit olan lambda sihalotrinin *Allium* kök ucu hücrelerinde MDA düzeyinde artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir [102]. Gabbianelli ve arkadaşları 150mg/kg permetrin uygulamasının sıçanlarda lipid peroksidasyonunu arttırdığını, GSH ve KAT aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir [38].

Permetrin ile birlikte Zoex uygulamasının *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde antioksidan enzim seviyelerinde, GSH ve MDA düzeylerinde iyileşme sağladığı belirlenmiştir. 20 µg/mL Zoex+permetrin uygulanan grupta sadece permetrin uygulanan gruba kıyasla MDA düzeyinde 2,2 kat, SOD aktivitesinde 1,6 kat, KAT aktivitesinde 1,5 kat azalma, azalan GSH seviyesinde ise 1,3 kat yeniden artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar Zoex uygulamasının permetrin tarafından bozulan antioksidan-oksidian denge üzerinde iyileştirici etkisi olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte 10 µg/mL ve 20 µg/mL Zoex uygulanan grup V ve VI'ya ait değerler kontrol grubu seviyelerine ulaşamamıştır. Zoex'in antioksidan denge üzerindeki bu iyileştirici etkisi Zoex içeriğinde bulunan flavon, flavonoid, anthosiyenin, kumarin, kateşin, gingerol ve shagaol gibi aktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Özellikle Zoex içeriğinde bulunan gingerol ve shagaol serbest

radikal düzeyini azaltıcı ve glutatyon düzeylerini arttırıcı etkiye sahiptir. Bu etkiler hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Zoex'in permetrinin antioksidan sistem üzerinde gösterdiği toksisiteye karşı koruyucu özelliği içerdiği aktif bileşenlerin biyolojik aktivitelerinin kümülatif bir sonucudur [80, 81]. Literatürde Zoex'in permetrin tarafından indüklenen oksidatif strese karşı etkilerini araştıran çalışma bulunmamakla birlikte farklı kimyasalların toksik etkilerine karşı koruyucu özelliği rapor edilmiştir. Fahmi ve arkadaşları zencefilin kimyasal ajan maruziyetinde artan MDA düzeyini azalttığını rapor etmişler, bu azalmayı ise lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ile ilişkilendirerek ve zencefilin antioksidan özelliğine vurgu yapmışlardır.

Tablo 4.4. Permetrin ve Zoex uygulamasının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi

Gruplar	MDA ($\mu\text{M g}^{-1}\text{FW}$)	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	SOD ($\text{U mg}^{-1}\text{FW}$)	KAT ($\text{OD}_{240\text{ nm min.g}^{-1}\text{FW}}$)
Grup I	7,18 $\pm$ 1,56 ^d	4,9 $\pm$ 0,45 ^a	60,48 $\pm$ 6,12 ^d	0,58 $\pm$ 0,72 ^d
Grup II	7,10 $\pm$ 1,52 ^d	5,1 $\pm$ 0,97 ^a	58,74 $\pm$ 5,89 ^d	0,60 $\pm$ 0,75 ^d
Grup III	7,00 $\pm$ 1,50 ^d	5,3 $\pm$ 0,87 ^a	52,90 $\pm$ 5,66 ^d	0,54 $\pm$ 0,68 ^d
Grup IV	30,90 $\pm$ 2,94 ^a	2,7 $\pm$ 0,33 ^c	150,84 $\pm$ 13,58 ^a	2,14 $\pm$ 1,18 ^a
Grup V	22,56 $\pm$ 2,55 ^b	2,9 $\pm$ 0,19 ^c	125,76 $\pm$ 11,24 ^b	1,88 $\pm$ 0,96 ^b
Grup VI	15,86 $\pm$ 1,98 ^c	3,8 $\pm$ 0,42 ^b	90,85 $\pm$ 7,16 ^c	1,42 $\pm$ 0,81 ^c

* Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir. Aynı sütün içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar $p<0.05$ 'de önemlidir.

4.5. Anatomik hasarlar

Permetrin ve Zoex uygulamasının meristematik hücrelerde indüklediği anatomik hasarlar ve her bir gruba ait hasarların sıklığı Tablo 4.5 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Kontrol grubu ve Zoex uygulanan Grup I, II ve III'te normal meristem doku anatomisi gözlenirken permetrin uygulanan grupta epidermis hücre hasarı, yassılaşmış hücre çekirdeği, korteks hücre hasarı, korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma ve belirgin olmayan iletim doku gibi anormallikler tespit edilmiştir. Bu anormallikler hücrelerdeki permetrin toksisitesi ya da hücrenin permetrine karşı oluşturduğu tolerans mekanizmaları ile ilişkilidir. Korteks hücre çeperinde kalınlaşma hücrenin permetrin toksisitesine karşı geliştirdiği bir tolerans

mekanizmasıdır. Hücreler toksik ajandan kaynaklanan stres varlığında lignin, selüloz, süberin, kütin gibi maddeleri korteks hücresinde biriktirmekte ve hücre çeperinin kalınlaşması gibi anatomik değişikliğe uğramaktadır. Bu değişiklik toksik ajanlara karşı bariyer görevi görmekte ve merkezi silindire toksik maddelerin erişimi engellenmektedir [103, 104]. Hücre çekirdeğinde gözlenen yassılaşma permetrinin neden olduğu genotoksik ve biyokimyasal değişikliklerin kümülatif etkisi ile ilişkilendirilebilir. Hücre bütünlüğünü bozan toksisite sonucu hücre içi basınçta ve hücre iskeletinde gözlenen olası bir değişiklik, organellerin şekil değişikliklerine yol açabilir. Hücre çekirdeği genellikle küresel veya elips şeklindedir. Nükleer hacim ve protein konsantrasyonundaki değişiklikler, DNA bütünlüğündeki ve yoğunluğundaki bozulma nükleer şekil değişikliklerine neden olabilir [105, 106]. Yassılaşmış hücre çekirdeği, permetrin tarafından indüklenen nükleer membran lipidlerinin peroksidasyonu, MN ve KA oluşumları sonucunda DNA bütünlüğünün bozulması, stoplazmik makromoleküllerin oksidasyonu/denatürasyonu/agregasyonuna bağlı olarak gelişen hücre içi basıncında değişiklikler ile açıklanabilir. Permetrin tarafından indüklenen tüm bu değişimler hücre içi homeostaside bozulmalara, hücre içi yoğunluğunda değişimlere ve doğal olarak hücre içi basınçta anormalliklere neden olmaktadır. Literatürde *Allium cepa*'da permetrin tarafından indüklenen anatomik hasarların rapor edildiği bir çalışma bulunmazken pek çok toksik ajanın indüklediği anatomik hasarlara rastlamak mümkündür. Benzer şekilde Yalçın ve arkadaşları stres varlığında epidermis hücre deformasyonu ve hücre duvarı kalınlaşması gibi kök anatomisinde gözlenen pek çok anatomik varyasyon olduğunu bildirmişlerdir [70].

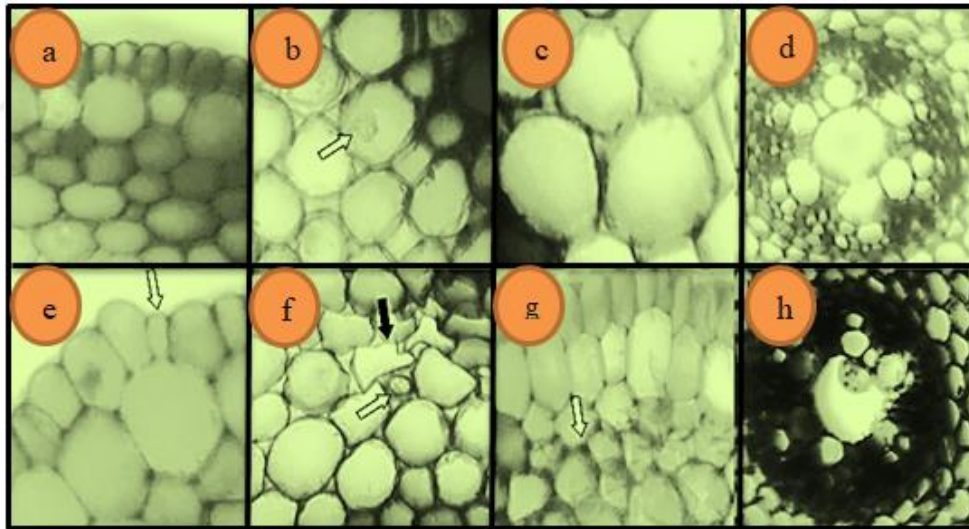
Permetrin ile birlikte Zoex uygulaması anatomik hasarların görülme sıklığında azalma sağlamıştır. 10 µg/mL ve 20 µg/mL Zoex uygulaması anatomik hasarların önemli derecede azalmasına neden olarak önemli bir koruma sağlamış, en belirgin koruma 20 µg/mL Zoex uygulanan Grup VI'da elde edilmiştir. 20 µg/mL Zoex uygulanan Grup VI'da korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma ve belirgin olmayan iletim doku anormallikleri hiç gözlenmezken, epidermis hücre hasarı, yassılaşmış hücre çekirdeği ve korteks hücre hasarları önemli derecede azalmıştır. Zoex'in anatomik yapı üzerindeki koruyucu etkisi, permetrinin meristem hücrelerinde indüklediği fizyolojik, biyokimyasal ve sitogenetik anormalliklerin Zoex varlığında

azalması ile ilişkilendirilebilir. Permetrinin hücre membranı, nükleer membran, makromoleküller, antioksidan sistem üzerinde oluşturduğu toksisite anatomik yapıda da değişime neden olmuştur. Zoex bu toksisiteleri azaltarak anatomik yapının da korunmasını sağlamıştır.

Tablo 4.5 Permetrinin teşvik ettiği anatomik hasarlara karşı Zoex'in koruyucu rolü

Gruplar	EHH	YHÇ	KHH	KHÇK	BİD
Grup I	-	-	-	-	-
Grup II	-	-	-	-	-
Grup III	-	-	-	-	-
Grup IV	+++	+++	+++	++	++
Grup V	++	++	++	+	+
Grup VI	+	+	+	-	-

* EHH: epidermis hücre hasarı, YHÇ: yassılaştırmış hücre çekirdeği, KHH: korteks hücre hasarı, KHÇK: korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma, BİD: belirgin olmayan iletim doku. (-): hasar yok, (+): az hasar, (++) : orta hasar, (+++) : şiddetli hasar



Şekil 4.5. Permetrinin sebep olduğu meristematik hücre hasarları. Epidermis hücrelerinin normal görünümü (a), hücre çekirdeğinin normal görünümü-oval (b), korteks hücrelerinin normal görünümü (c), iletim dokunun normal görünümü (d), epidermis hücre hasarı (e), yassılaştırmış hücre çekirdeği-beyaz ok (f), korteks hücre hasarı-siyah ok (f), korteks hücre çeperinde kalınlaşma (g), belirgin olmayan iletim doku (h).

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tarımsal uygulamalarda verim ve ürün kalitesinde iyileştirme amacıyla kullanılan kimyasal mücadele beraberinde pek çok sorunu da ortaya çıkarmıştır. Çevre kirliliği başta olmak üzere hedef olmayan canlılardaki toksik etkiler pestisit kullanımı sonucu oluşan önemli sorunlardır. Pek çok pestisit kümülatif özellik sergilemekte ve birçok canlı organizmada birikerek besin zincirleri yoluyla da organizmalar arasında taşınabilmektedir. Tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan piretroidler pestisitlerin geniş bir sınıfını oluşturmaktadır ve krizantem bitkisinin kurutulmuş çiçeklerinin ekstraksiyonu ile elde edilen doğal bir insektisit grubudur ve çabuk bozunma özelliğine sahiptir. Bu sorun daha dayanıklı olan sentetik piretroidlerin sentezi ile aşılmış ve geniş çeşitlilikte sentetik piretroidler üretilmiştir.

Permetrin sentetik piretroid kimyasal sınıfında yer alan ve tarım alanlarında, hayvancılık sektöründe, evsel ilaçlamada yoğun olarak kullanılmaktadır. Yaygın kullanımı sayesinde permetrin çevreye çeşitli yollarla kontamine olmakta ve hedef dışı canlılar üzerinde toksik etki sergilemektedir. Literatürde permetrinin hedef dışı organizmalardaki toksik etkileri özellikle rat ve sıçan gibi canlılarda detaylı olarak incelenmiştir. Fakat tarımsal uygulamalar sonucu permetrin maruziyetine maruz kalan hedef dışı canlılardan bitkiler üzerindeki çalışmalar yeterli düzeyde değildir. Bu kapsamda, bu çalışmada permetrinin hedef dışı organizmalardan olan *A. cepa* kök ucu hücrelerinde oluşturduğu toksik etkiler araştırılmış, ayrıca *Zoex'in* bu toksisiteyi azaltıcı etkisi de incelenmiştir. *Z. officinale* yumruları yoğun fitokimyasal içeriği sayesinde önemli farmakolojik ve biyolojik aktiviteye sahiptir. Literatürde *Z. officinale*'nin farmakolojik ve biyolojik özellikleri pek çok çalışmada araştırılmıştır. Çeşitli kimyasal ajanlara karşı *Z. officinale*'nin koruyucu özelliği ile ilgili araştırmalar da literatürde oldukça yaygındır. Fakat permetrinin toksik etkilerine karşı *Z. officinale*'nin etkileri üzerine bir çalışma rapor edilmemiştir. Bu bakımdan

bu çalışma literatürde permetrinin *A. cepa*'daki etkileri ve Zoex'in bu etkilere karşı koruyuculuğu hakkında ilk veri girişini sağlamıştır.

Permetrin *A. cepa*'da çimlenme ile ilgili parametrelerde gerilemeye neden olmuştur. Özellikle kök uzuması permetrinin hücre bölünmesini baskıladığını göstermektedir. Bu bulgu, MI verileri ile de örtüşmektedir. Sitogenetik parametrelerden incelenen MI oranı permetrin uygulaması ile azalmıştır ve bu sonuç çimlenmedeki gerilemeyi açıklamaktadır. Kök ucu meristem dokuları sık bölünen dokulardır ve permetrin bu dokularda MI oranını düşürmüş, hücre bölünmesini baskılamış bu yolla kök uzamasını, ağırlık kazanımını ve çimlenmeyi de engellemiştir. Permetrin aynı zamanda çeşitli kromozomal hasarlara ve MN oluşumlarına da neden olmuştur. Bu hasarlar kök ucu hücrelerinde oluşan oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir. Bu değerlendirme kök ucunda araştırılan MDA düzeyi ve antioksidan kapasite bulguları ile de desteklenmiştir. Permetrin uygulaması kök ucunda MDA düzeyini arttırırken GSH, SOD ve KAT düzeylerini de azaltmıştır. Bu değişimler kök ucunda permetrinin oksidatif strese bağlı olarak antioksidan/oksidan dinamiklerde değişime neden olduğunu göstermiştir. Tüm bu değişimler kök anatomisinde de varyasyonlara neden olmuştur. Anatomideki bu değişimler epidermis hücre hasarı, yassılaştırmış hücre çekirdeği, korteks hücre hasarı, korteks hücre çeperlerinde kalınlaşma ve belirgin olmayan iletim dokudur. Bu değişimlerden hücre çeperinde kalınlaşma permetrine karşı tolerans mekanizmalarından, epidermis hücre hasarı, belirgin olmayan iletim doku, yassılaştırmış hücre çekirdeği permetrin etkisi sonucunda oluşan anormalliklerdir. Permetrinin anatomik, biyokimyasal, sitogenetik, fizyolojik etkileri Zoex varlığında azalmıştır. Zoex permetrin tarafından indüklenen MN ve KA sıklıklarında azalmaya neden olmuş, azalan MI'nın yeniden artmasını sağlamıştır. Antioksidan ve oksidan dengenin de yeniden kurulmasına katkı sağlayarak çimlenme sürecini de iyileştirmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile permetrinin *A. cepa*'da fizyolojik, biyokimyasal, sitogenetik ve anatomik yönden toksik etkilere neden olduğu, Zoex'in ise tüm bu toksik etkilere karşı azaltıcı/iyileştirici bir özellik sergileyerek koruyucu rolü olduğu belirlenmiştir. Literatürde permetrin toksisitesi üzerine çeşitli hedef dışı canlılar ile yapılmış pek çok çalışma bulunmakla birlikte bitkilerdeki toksik etkinin araştırıldığı

alışmalar yeterli düzeyde değildir. Bu bakımdan bu alışma Zoex'in permetrin toksisitesine karşı doza bağlı bir koruyucu rol sergilediğini rapor eden ilk çalışma niteliği de taşımaktadır. Toksik etkilerin ve bu etkilere karşı doğal ürünlerin koruyucu rolünün çoklu parametrelerle araştırıldığı ve her bir bulgunun birbiri ile ilişkilendirilerek toksisite mekanizmasının aydınlatıldığı in vivo çalışmalar oldukça değerlidir. Bu noktadan hareketle, bu çalışma toksisiteye karşı koruyucu maddelerin etki mekanizmalarını inceleyen pek çok araştırmaya yön verecek ve rehber olacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] Tiryaki O., Canhilal R., Horuz S. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Erciyes Ün. Fen Bil. Ens. Fen Bil. Derg., 26(2), 154-169, 2010.
- [2] Dubus I.G., Hollis J.M., Brown C.D., Pesticide in rainfall in Europe. Environ. Pollut., 110, 331-344, 2000.
- [3] Junquera P., Permethrin: safety summary for veterinary use in dogs, cats, horses, cattle, sheep, goats, swine and poultry. Poisoning, intoxication, overdose, antidote. Parasitipedia, 1, 2021.
- [4] Weidinger A., Kozlov A.V., Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. Biomolecules, 5(2), 472-484, 2015.
- [5] Policegoudra R.S., Rehna K., Rao L.J., Aradhya S.M., Antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity and platelet aggregation inhibitory activity of a novel molecule isolated and characterized from mango ginger rhizome. J. Biosci., 35(2), 231-240, 2010.
- [6] Banerjee S., Mullick H.I., Banerjee J., Ghosh A., *Zingiber officinale*: ‘a natural gold’. Int. J. Pharmaceutical. Bio-Sci., 2, 283-294, 2011.
- [7] Govindarajan V.S., Ginger: Chemistry, technology and quality evaluation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 17(1), 1982.
- [8] Rank J., Nielsen M.H., Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. Mut. Res., 312, 17-24, 1994.
- [9] Al-Saleh I.A., Pesticides: a review article. J. Env. Pathol. Tox. Onc., 13(3), 151-161, 1994.
- [10] Tadeo, J.L., Albero, B., Pérez, R.A., Pesticides: classification and properties. In Analysis of pesticides in food and environmental samples. CRC Press, 1-10, 2019.
- [11] Wojciechowski M., Stepnowski P., Gołębiowski M., The use of insecticides to control insect pests. Invertebrate Surviv. J., 13(1), 210-220, 2016.

- [12] Laskowski D.A., Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev. Environ. Contam. Tox.*, 49, 170, 2002.
- [13] Jeneen I., Can Permethrin Treated Clothing Help You Avoid Mosquito Bites?. *Consumer Reports*, 2019.
- [14] *SI Chemical Data Book* (4th ed.), Gordon Aylward and Tristan Findlay, Jacaranda Wiley.
- [15] *The Merck Index*, 7th edition, Merck & Co, Rahway, New Jersey, USA, 1960.
- [16] Crow J.A., Borazjani A., Potter P.M., Ross M.K., Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicol. App. Pharm.*, 221(1), 1-12, 2007.
- [17] Willemine M.E., Kadar A., de Sousa G., Leclerc E., Rahmani R., Brochot C., In vitro human metabolism of permethrin isomers alone or as a mixture and the formation of the major metabolites in cryopreserved primary hepatocytes. *Tox. In Vitro.*, 29(4), 803-812, 2015.
- [18] Nakamura Y., Sugihara K., Sone T., Isobe M., Ohta S., Kitamura S., The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*, 235(3), 176-184, 2007.
- [19] Heder A.F., Hirsch-Ernst K.I., Bauer D., Kahl G.F., Desel H., Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharm.*, 62(1), 71-79, 2001.
- [20] Wang X., Martínez M.A., Dai M., Chen D., Ares I., Romero A., et al., Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ. Res.*, 149, 86-104, 2016.
- [21] Weidinger A., Kozlov A.V., Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472-484, 2015.
- [22] Stadtman E.R., Levine R.L., Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208, 2000.
- [23] Sellami B., Louati H., Dellali M., Aissa P., Mahmoudi E., Coelho A.V., et al., Effects of permethrin exposure on antioxidant enzymes and protein status in Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. *ESPR.*, 21(6), 4461-4472, 2014.
- [24] Castegna A., Drake J., Pocernich C., Butterfield D.A., Protein carbonyl levels—an assessment of protein oxidation. *Humana Press*, 161-168, 2003.

- [25] Breen A.P., Murphy J.A., Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1033-1077, 1995.
- [26] Helbock H.J., Beckman K.B., Ames B.N., 8-Hydroxy-deoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol.*, 300, 156-166, 1999.
- [27] Catalá, A., An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 1482-1495, 2006.
- [28] VanderVeen L.A., Hashim M.F., Shyr Y., L.J. Marnett Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 14247-14252, 2003.
- [29] Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J., Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 31426-31433, 2003.
- [30] Turkez H., Aydin E., The effects of taurine on permethrin induced cytogenetic and oxidative damage in cultured human lymphocytes. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 63(1), 27, 2012.
- [31] Nasuti C., Falcioni M.L., Nwankwo I.E., Cantalamessa F., Gabbianelli R., Effect of permethrin plus antioxidants on locomotor activity and striatum in adolescent rats. *Toxicology*, 251(1-3), 45-50, 2008.
- [32] Jones D.P., Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance, *Meth. Enzymol.*, 348, 93-112, 2002.
- [33] Griffith O.W., Meister A., Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *PNAS*, 76, 5606-5610, 1979.
- [34] Vadhana M.D., Carloni M., Nasuti C., Fedeli D., Gabbianelli R., Early life permethrin insecticide treatment leads to heart damage in adult rats. *Exp. Gerontol.*, 46(9), 731-738, 2011.
- [35] Abdullah L., Evans J.E., Montague H., Reed J.M., Moser A., Crynen G., et. al., Chronic elevation of phosphocholine containing lipids in mice exposed to Gulf War agents pyridostigmine bromide and permethrin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 40, 74-84, 2013.
- [36] Chargui I., Falcioni M.L., Cheikh H.B., Gabbianelli R., Erythrocyte antioxidants enzymes imbalance following subcutaneous pyrethroid treatments in rats of different sex. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 30(2), 116-120, 2010.

- [37] Falcioni M.L., Nasuti C., Bergamini C., Fato R., Lenaz G., Gabbianelli R., The primary role of glutathione against nuclear DNA damage of striatum induced by permethrin in rats. *Neuroscience*, 168(1), 2-10, 2010.
- [38] Gabbianelli R., Palan M., Flis D.J, Fedeli D., Nasuti C., Skarydova L., Ziolkowski W., Imbalance in redox system of rat liver following permethrin treatment in adolescence and neonatal age. *Xenobiotica*, 43, 1103-1110, 2013.
- [39] Yang Y., Ma H., Zhou J., Liu J., Liu W., Joint toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish. *Chemosphere*, 96, 146-154, 2014.
- [40] Mahmoud N., Dellali M., Aissa P., Mahmoudi E., Acute toxicities of cadmium and permethrin on the pre-spawning and post-spawning phases of *Hexaplex trunculus* from Bizerta Lagoon, Tunisia. *Environ. Monit. Assess.*, 84(10), 5851-5861, 2012.
- [41] Ross C., Olsen K., Henry M., Pierce R., Mosquito control pesticides and sea surface temperatures have differential effects on the survival and oxidative stress response of coral larvae. *Ecotoxicology*, 24(3), 540-552, 2015.
- [42] Awang D.V.C., Ginger. *Can. Pharm. J.*, 25, 309-311, 1992.
- [43] Marwat S.K., Shoaib M., Khan E.A., Rehman F., Ullah H., Phytochemistry and bioactivities of Quranic plant, zanjabil-ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 15(5), 707-713, 2015.
- [44] Bisset, N.G., Wichtl, M., Herbal drugs and pytopharmaceuticals. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, CRC Press, Boca Raton, 91-95, 1994.
- [45] Evans, W.C., Trease and Evans Pharmacognosy, 16th Edn, Saunders Elsevier, 289-292, 2002.
- [46] <https://materiamedicaresource.wordpress.com/2013/02/22/ginger/>. Eriřim Tarihi: 15.11.2021
- [47] <https://www.zastavki.com/eng/Nature/Flowers/wallpaper-67035-30.html>. Eriřim Tarihi: 11.10.2021
- [48] <https://www.manhingfood.com/tr/fresh-ginger/58361408.html>. Eriřim Tarihi: 20.09.2021
- [49] Ali B.H., Blunden G., Tanira M.O., Nemmar A., Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale*

- Roscoe): a review of recent research. *Food Chem. Toxicol.*, 46(2), 409-420, 2008.
- [50] Govindarajan V.S., Ginger: Chemistry, technology and quality evaluation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 17(1), 1982.
 - [51] López E.I.C., Balcázar M.F.H., Mendoza J.M.R., Ortiz A.D.R., Melo M.T.O., Parrales R.S., et al., Antimicrobial activity of essential oil of *Zingiber officinale* roscoe (Zingiberaceae). *AJPS.*, 8(07), 1511, 2017.
 - [52] Singh G., Maurya S., Catalan C., De Lampasona M.P., Studies on essential oils, part 42: Chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour Fragr. J.*, 20(1), 1-6, 2005.
 - [53] Burt S., Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223-253, 2004.
 - [54] Kabuto H., Nishizawa M., Tada M., Higashio C., Shishibori T., Kohno M., Zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] sprevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression in mouse striatum and increases superoxide scavenging activity in serum. *Neurochem. Res.*, 30, 325-332, 2005.
 - [55] Ghasemzadeh A., Jaafar H.Z., Rahmat A., Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15, 6231-6243, 2010.
 - [56] Sak, S.A., Al-Amoudi W.M., Effect of ginger extract on deltamethrin induced histomorphological and immunohistochemical changes in testes of albino rats. *Life Sci. J.*, 9(1), 771-778, 2012.
 - [57] Sharma P., Singh R., Dichlorvos and lindane induced oxidative stress in rat brain: Protective effects of ginger. *Pharm. Res.*, 4(1), 27, 2012.
 - [58] Ahmed R.S., Suke S.G., Seth V., Chakraborti A., Tripathi A.K., Banerjee B.D., Protective effects of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) on lindane-induced oxidative stress in rats. *Phytother. Res.*, 22, 902-906, 2008.
 - [59] Levan A., The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24, 471- 486, 1938.
 - [60] Fiskesjö G., The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112, 1985.
 - [61] Rank J., Nielsen M.H., Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mut. Res.*, 312, 17- 24, 1994.

- [62] Vicentini V.E.P., Camparoto M.L., Teixeira R.O., Mantovani M.S., Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: Medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scien.*, 23, 593-598, 2001.
- [63] Leme D.M., Marin-Morales M.A., *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat. Res./Reviews in Mut. Res.*, 682(1), 71-81, 2009.
- [64] Leme D.M., Angelis D.F., Marin-Morales M.A., Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat. Toxicol.*, 88, 214-219, 2008.
- [65] Hoshina, M.M., Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 52, 2002.
- [66] Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M., Toman M.J., The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutat. Res.*, 368, 171-179, 1996.
- [67] Russel, P. J., Chromosomal mutation, B. Cummings (Ed.), Genetics, Pearson Education Inc., San Francisco, 595-621, 2002.
- [68] Fernandes T.C.C., Mazzeo D.E.C., Marin-Morales M.A., Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.*, 88, 252-259, 2007.
- [69] Akgündüz M.Ç., Çavuşoğlu K., Yalçın E., The potential risk assessment of phenoxyethanol with a versatile model system. *Sci. Rep.*, 10(1), 1-10, 2020.
- [70] Yalçın E., Uzun A., Çavuşoğlu K., In vivo epiclorohidrine toxicity: cytogenetic, biochemical, physiological, and anatomical evidences. *ESPR.*, 26, 22400-22406, 2019.
- [71] Beauchamp C., Fridovich I., Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytic. Biochem.*, 44, 276-287, 1971.
- [72] Beers R.F., Sizer I.W., A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 195, 133-140, 1952.
- [73] Unyayar S., Celik A., Cekic F.O., Gozel A., Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21, 77-81, 2006.

- [74] Kurt D., Acar A., Çavuşoğlu D., Yalçın E., Çavuşoğlu K., Genotoxic effects and molecular docking of 1, 4-dioxane: combined protective effects of trans-resveratrol. *ESPR.*, 28, 54922–54935, 2021.
- [75] Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., ET. AL., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Env. Mol. Mut.*, 35(3), 206-221, 2000.
- [76] Końca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., et al. a cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mut. Res./Genetic Toxicol. Env. Mut.*, 534(1-2), 15-20, 2003.
- [77] Tang W., Wang D.I., Wang J., Wu Z., Li L., Huang M., et al., Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007, 2018.
- [78] Çavuşoğlu K., Kaya A., Yılmaz F., Yalçın E., Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. *Env. Toxicol.*, 27(10), 583-589, 2012.
- [79] Al-Nahain A., Jahan R., Rahmatullah M., *Zingiber officinale*: A potential plant against rheumatoid arthritis, *Arthritis*, 2014, 2014.
- [80] Dugasani S., Pichika M.R., Nadarajah V.D., Balijepalli M.K., Tandra S., Korlakunta J.N., [6] -gingerol, [8] -gingerol, [10] -gingerol ve [6] -shogaol'ün karşılaştırmalı antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri. *J. Ethnopharmacol.*, 127 (2), 515-520, 2020.
- [81] Kuhad A., Tirkey N., Pilkhwal S., Chopra K.,). 6-Gingerol, sıçanlarda cisplatin kaynaklı akut böbrek yetmezliğini önler. *BioFactors*, 26 (3), 189-200, 2006.
- [82] Masuda Y., Kikuzaki H., Hisamoto M., Nakatani N., Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *Biofactors*, 21, 293-296, 2004.
- [83] Morakinyo A.O., Oludare G.O., Aderinto O.T., Tasdup A., Antioxidant and free radical scavenging activities of aqueous and ethanol extracts of *Zingiber officinale*. *Physiology- Scholarly Pub.*, 2011.
- [84] Amer S.M., Al Ö E.M., Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia*, 39, 633-643, 1974.
- [85] Fenech M., Neville S., Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Env. Mol. Mut.*, 19, 27-36, 1992.
- [86] Delic N., Effect of permethrin on mitotic activity of cultured human lymphocytes. *Pesticides*, 13, 233-238, 1998.

- [87] Roma G.C., De Oliveira P.R., Araujo A.M., Bechara G.H., Mathias M.I.C., Genotoxic and mutagenic effects of permethrin in mice: micronuclei analysis in peripheral blood erythrocytes. *Mic. Res. Tech.*, 75(12), 1732-1736, 2012.
- [88] Okesola M.A., Ajiboye B.O., Oyinloye B.E., Ojo O.A., Effect of *Zingiber officinale* on some biochemical parameters and cytogenic analysis in lead-induced toxicity in experimental rats. *Tox. Mech. Meth.*, 29(4), 255-262, 2019.
- [89] Khanna N., Sharma S., *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. *Indian J. Pharm. Biol. Res.*, 1(03), 105-11, 2013.
- [90] Al-Amoudi W.M., (2018). Toxic effects of Lambda-cyhalothrin, on the rat thyroid: Involvement of oxidative stress and ameliorative effect of ginger extract. *Tox. Rep.*, 5, 728-736, 2018.
- [91] Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S., Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 161-175, 2010.
- [92] Hayyan M., Hashim M.A., Al Nashef I.M., Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.*, 116 (5), 3029-3085, 2016.
- [93] Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D., Superoxide dismutase in plants. *Critical Rev. Plant Sci.*, 13, 199-218, 1994.
- [94] Scandalias J.G., Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.*, 28, 1-41, 1990.
- [95] Cheeseman J.M., Hydrogen peroxide and plant stress: A challenging relationship. *Plant Stress*, 1, 4-15, 2007.
- [96] Youssef M.M., Azooz M.M., Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Okra (*Hibiscus esculentus* cv. Hassawi). *Sci. Int.*, 1, 12-16, 2013.
- [97] Pizzimenti S., Ciamporcero E., Daga M., Pettazzoni P., Arcaro A., Cetrangolo G., et al., Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins, *Front. Phy.*, 4, 242, 2013.
- [98] Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M., Borovic S., Zarkovic K., Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J. Proteom.*, 92, 239-247, 2013.
- [99] Kerksick C., Willoughby D., The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Internat. Soc. Sports Nutr.*, 2(2), 1-7, 2005.

- [100] Hausladen, A., Alscher, R.G., Glutathione In: Antioxidants in Higher Plants. R.G. Alscher and J.L. Hess (eds) CRC Press, Boca Raton. 1-30, 1993.
- [101] Hell R., Bergmann L., Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta*, 180, 603-612, 1990.
- [102] Çavuşoğlu K., Gür B., Yalçın E., Demirtaş G., Çiçek F., The effect of lambda-cyhalothrin on root tip cytology, pigment contents and antioxidant defense system of *Allium cepa*. *Cytologia*. 79 (1), 95-101, 2014.
- [103] Shu X., Yin L., Zhang Q., Wang W., Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L., *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 19, 893-902, 2012.
- [104] Singh D., Pal M., Singh R., Singh C.K., Chaturvedi A.K., Physiological and biochemical characteristics of *Vigna* species for Al stress tolerance. *Acta Physiol. Plant.*, 37, 1-13, 2015.
- [105] Dahl K.N., Ribeiro A.J., Lammerding J., Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ. Res.*, 102, 1307-1318, 2008.
- [106] Dauer W.T., Worman H.J., The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev. Cell.*, 17, 626-638, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

Damla HİMTAŞ ilk, orta ve lise eğitimini Bulancak-Giresun'da tamamladı. 2012 yılında Bulancak Lisesi'nden mezun oldu. 2014 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2019 yılında bitirdi. 2020 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programından Şubat 2022'de başarı ile mezun oldu. 2020 yılında biyoloji öğretmeni olarak özel bir kurumda çalışmaya başladı. Halen biyoloji öğretmeni olarak çalışmaktadır.