



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



Yüksek Lisans Tezi

**PESTİSİTLERİN OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF KARACİĞER
HASARINA KARŞI LUPEOLÜN ROLÜ**

Melis ÇÖREMEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN**

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu alışma, 24.06.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Önder KILIÇ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Sevim TUNALI
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpařa
Mühendislik Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32419 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana yardımcı olan, desteğini hiç eksik etmeyen, bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşarak yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN'a en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamın birçok aşamasında yardımlarını ve bilgisini paylaşan sayın Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ'a, biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesinde emeği geçen Dr. Öğr. Üyesi Burcu TÜRKYILMAZ'a ve tez süresince yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. İlknur BUGAN'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Deney süresince yardımlarından dolayı Ayça SEZEN US ve Hüseyin US'a çok teşekkür ederim. Ayrıca hayvan deneylerinin gerçekleştiği Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına ve teknik yardımları için Farmasina Firmasına teşekkür ederim.

Labaratuvarında çalışmalarımıdaki destekleri için sevgili lisans öğrencileri Zeynep KOÇASLAN, Simge ERGÜVEN ve Faruk ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Yıllardır her zaman yanımda olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım Göknıl SÜSLER'e; tez aşaması boyunca her anımda yanımda olan, her türlü yardımı sağlayan ve benim için yeri ayrı olan sevgili Ercan SIKDOKUR'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen canım annem Aydan VARDARLI'ya ve babam Kadir ÇÖREMEN'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2020

Melis ÇÖREMEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. PESTİSİTLER	4
2.1.1. Organofosforlu Pestisitler.....	7
2.1.1.1. Malathion	9
2.1.1.2. Klorprifoz	10
2.1.1.3. Tebukonazol	11
2.2. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF HASAR	11
2.3. ANTİOKSİDAN SİSTEM.....	13
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	14
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz	14
2.3.1.2. Katalaz	14
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz	14
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	15
2.3.2.1. Glutasyon.....	15
2.3.2.2. Lupeol.....	15
2.4. KARACİĞER	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. HAYVANLARIN TEMİNİ	20
3.1.1. Deney Protokolü	20
3.1.2. Diseksiyon	21
3.2. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER	21
3.2.1. İmmünohistokimyasal Yöntemler	22

PCNA İmmünohistokimyası	22
3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER	23
3.3.1. Karaciğer Dokusu AChE Seviyelerinin Belirlenmesi	23
3.3.2. Karaciğer Dokusu ve Serumda AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi	24
3.3.3. Karaciğer Dokusu ROT Seviyelerinin Tayini	25
3.3.4. Karaciğer Dokusu LPO Seviyelerinin Belirlenmesi.....	25
3.3.5. Karaciğer Dokusu GSH Seviyelerinin Belirlenmesi	26
3.3.6. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
3.3.7. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesinin Tayini.....	27
3.3.8. Serum TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi	28
3.3.9. Total Protein Tayini.....	29
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	30
4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	30
4.1.2. Mısır Yağı Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	32
4.1.3. Malathion Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	33
4.1.4. Klorprifoz Grubuna Ait Histolojik Bulgular	35
4.1.5. Tebukonazol Grubuna Ait Histolojik Bulgular	37
4.1.6. Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	39
4.1.7. Malathion + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular	41
4.1.8. Klorprifoz + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	42
4.1.9. Tebukonazol + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular.....	44
4.1.10. Karaciğer Histolojik Hasar Skoru	46
4.2. PCNA İMMÜNOHİSTOKİMYASINA AİT BULGULAR.....	47
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR	53
4.3.1. Karaciğer Dokusu AChE Seviyelerine Ait Bulgular	53
4.3.2. Karaciğer Dokusu AChE Aktivitesine Ait Bulgular	55
4.3.3. Serum AChE Aktivitesine Ait Bulgular	57
4.3.4. Karaciğer Dokusu ROT Seviyelerine Ait Bulgular	59
4.3.5. Karaciğer Dokusu LPO Seviyelerine Ait Bulgular	61
4.3.6. Karaciğer Dokusu GSH Seviyelerine Ait Bulgular	63
4.3.7. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesine Ait Bulgular	65
4.3.8. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesine Ait Bulgular	67

4.3.9. Serum TNF- α Seviyelerine Ait Bulgular.....	69
5. TARTIşMA VE SONUÇ	71
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİş.....	97



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2. 1: Pestisit kullanımının yıllara göre değişim grafiği (Fao, 2017)	5
Şekil 2. 2: Organofosforlu pestisitlerin genel kimyasal formülü	8
Şekil 2. 3: Malathionun kimyasal yapısı	9
Şekil 2. 4: Klorprifozun kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2. 5: Tebukonazolün kimyasal yapısı.	11
Şekil 2. 6 : Lupeolün kimyasal yapısı.	16
Şekil 2. 7: Karaciğer lobülü genel görünümü (Guleç ve diğ., 2010)	18
Şekil 4. 1: Kontrol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE boyama, Bar: 100 µm.	31
Şekil 4. 2: Kontrol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'nun üçlü boyası, Bar: 100 µm.	31
Şekil 4. 3: Mısır yağı grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE, Bar: 100 µm.....	32
Şekil 4. 4: Mısır yağı grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'nun üçlü boyası, Bar: 100 µm.	33
Şekil 4. 5: Malathion grubu. (A) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), Vasküler konjesyon (★), HE, Bar:100 µm	34
Şekil 4. 6: Malathion grubu. Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, hiperemi (H), sinüzoidal genişleme (→), Vasküler konjesyon (★), Nekrotik alan (◁), fibrozis (dirsek ok), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.	35
Şekil 4. 7: Klorprifoz grubu. (A, B) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), Vasküler konjesyon (★), piknotik nukleus (kalın ok), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), nüklear vakuolizasyon (dirsek ok), HE, Bar: 100 µm.....	36
Şekil 4. 8: Klorprifoz grubu. Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, Vakuolizasyon (V), fibrozis (dirsek ok), hiperemi (H), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.	37

Şekil 4. 9: Tebukonazol grubu. (A, B) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), eosinofilik hücre (E), nükleer vakuolizasyon (dirsek ok), HE, Bar: 50 µm ve 100 µm.....	38
Şekil 4. 10: Tebukonazol grubu. Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, hiperemi (H), Vasküler konjesyon (★), fibrozis (dirsek ok), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.....	39
Şekil 4. 11: Lupeol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE, Bar: 100 µm.....	40
Şekil 4. 12: Lupeol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.	40
Şekil 4. 13: Malathion + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sentral ven (SV), HE, Bar: 100 µm.....	41
Şekil 4. 14: Malathion + Lupeol grubu. hiperemi (H), Vasküler konjesyon (★), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.....	42
Şekil 4. 15: Klorprifoz+ Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sinüzoidal genişleme (→), HE, Bar: 100 µm.....	43
Şekil 4. 16: Klorprifoz + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, Vasküler konjesyon (★), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100µm.	43
Şekil 4. 17: Tebukonazol + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sinüzoidal genişleme (→), HE, Bar: 100 µm.....	44
Şekil 4. 18: Tebukonazol + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, Vasküler konjesyon.....	45
Şekil 4. 19: Histolojik Hasar Skoru, (ortalama ± Standart sapma), *:p<0,05.....	47
Şekil 4. 20: PCNA pozitif hücrelerin görüldüğü karaciğer kesitleri (A-I). (A) Kontrol grubu, (B) Mısır Yağı grubu, (C) Lupeol grubu, (D) Malathion grubu, (E) Klorprifoz grubu, (F) Tebukonazol grubu, (G) Malation + Lupeol grubu, (H) Klorprifoz + Lupeol grubu, (I) Tebukonazol + Lupeol grubu, PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 100 µm.	52
Şekil 4. 21: % PCNA Pozitif Hücre Sayısı *:p<0,05; **: p< 0,005.	53
Şekil 4. 22: Karaciğer AChE Seviyeleri (ng mL ⁻¹), (ortalama ± Standart sapma). One way ANOVA ve post hoc Tukey test (p:0,05).	55
Şekil 4. 23: Karaciğer Dokusu AChE Aktivitesi (mU mg protein ⁻¹), (ortalama ± Standart sapma).....	57
Şekil 4. 24: Serum AChE Aktivitesi (U mL ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; **:p<0,005.....	59

Şekil 4. 25: Karaciğer Dokusu Reaktif Oksijen Türleri (ROT mg protein ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; **:p<0,005, ***:p<0,0001.....	61
Şekil 4. 26: Karaciğer Dokusu Lipid Peroksidasyonu (nmol MDA mg protein ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; ***:p<0,0001.....	63
Şekil 4. 27: Karaciğer Dokusu Glutasyon Seviyeleri, (nmol GSH mg protein ⁻¹),.....	65
Şekil 4. 28: Karaciğer Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi (mU mg protein ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; ***:p<0,0001.	67
Şekil 4. 29: Karaciğer Dokusu SOD Enzim Aktivitesi (U mg protein ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; **:p<0,005.	69
Şekil 4. 30: Serum TNF-α Seviyeleri (ng L ⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *: p<0,05; **:p<0,005;***:p<0,0001.	70

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 4. 1: Karaciğer dokusunun yarı kantitatif olarak değerlendirilmesi.	46
Tablo 4. 2: % PCNA Pozitif Hücre Sayısı (Ortalama $\pm$ Standart sapma).	52
Tablo 4. 3: Karaciğer Dokusu AChE Seviyeleri.....	54
Tablo 4. 4: Karaciğer dokusu AChE Aktivitesi.....	56
Tablo 4. 5: Serum AChE Aktivitesi.....	58
Tablo 4. 6: Karaciğer Dokusu ROT Seviyeleri.....	60
Tablo 4. 7: Karaciğer Dokusu Lipid Peroksidasyonu	62
Tablo 4. 8: Karaciğer Dokusu Glutasyon Seviyeleri.....	64
Tablo 4. 9: Karaciğer Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi	66
Tablo 4. 10: Karaciğer SOD Enzim Aktivitesi	68
Tablo 4. 11: Serum TNF- α Seviyeleri	70

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

Cu	: Bakır
Fe	: Demir
g	: Gram
H	: Hidrojen
Ha	: Hektar
Kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mn	: Manganez
kg	: Kilogram
µm	: Mikrometre
Zn	: Çinko
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ABTS	: Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
ALP	: Alkalen fosfotaz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AChE	: Asetilkolinesteraz
AST	: Aspartat transaminaz
CAT	: Katalaz
CP	: Klorprifoz
DDT	: Dikloro difenil trikloroethan
DMBA	: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit

ELİSA	: Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
FRAP	: Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
HE	: Hematoksilen - Eozin
HNE	: 4-hidroksi-2-e -nonenal
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LH	: Luteinleştirici hormon
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MAL	: Malathion
MDA	: Malondialdehit
NF-kB	: Nükleer faktör kappa B
OP	: Organofosforlu pestisitler
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TEB	: Tebukonazol

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PESTİSİTLERİN OLUŞTURDUĞU OKSİDATİF KARACİĞER HASARINA KARŞI LUPEOLÜN ROLÜ

Melis ÇÖREMEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN

Dünyadaki nüfus artışı ile paralel olarak artan besin ihtiyacını karşılamak ve açlık sorununun çözümlenebilmesi için özellikle tarımsal arazilerdeki pestisit kullanımı yıldan yıla artış göstermektedir. Pestisitler, zararlı canlıların (böcek, mantar vb.) kontrol altında tutulması için kullanılan bileşiklerdir. Pestisit kalıntılarının meyve ve sebzelerde birikim gösterdiği ve bu birikimin kabul gören sınırların çok üstünde olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Pestisit kullanımındaki artış beraberinde hem birçok çevre sorununu getirmekte hem de hedef olmayan organizmalarla birlikte insan sağlığını da tehdit etmektedir. Pestisitlerin yaygın kullanımının toprak, su, hava ve besinde kirlilikle sonuçlandığı, pestisitle yüklü yüzeylerden temas ile besinlerin kontamine olduğu ve bu yolla, yetişkin ve çocukların diyet yoluyla pestisitlere maruz kalmalarının potansiyel olarak arttığı bildirilmiştir. Dikloro difenil trikloroethan (DDT) gibi çevrede kalıcı organoklorlu pestisitlerin yasaklanmasından sonra biyolojik olarak daha kolay ayrışabilen bir alternatif olarak kullanılmaya başlanan organofosforlu pestisitler, şu anda dünyada en yaygın kullanılan pestisit grubudur. Ancak kolay ayrışabilme özelliklerine rağmen, organofosforlu pestisitlerin özellikle memeliler üzerinde akut toksisitesi daha yüksektir ve her yıl yaklaşık 100.000 insanın kazara maruz kalması sonucunda ölümüne sebep olmaktadır. Organofosforlu pestisitlere kronik maruziyetin, ileri dönemlerde nörodejeneratif hastalıklar, endokrin sistemde bozukluklar, solunum yolu rahatsızlıkları gibi birçok sağlık sorununu beraberinde getirebileceğine dair çalışmalar literatürde bulunmaktadır.

Pestisitlerin etkisiyle oksidatif stres parametrelerinde artış görülmektedir. Organofosforlu pestisitlerle oluşan oksidatif hasarın sebebinin, asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu ile artan serbest radikallerin olabileceğini gösteren *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Ancak pestisitlerin etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmış değildir ve araştırılması gereken birçok soru bulunmaktadır. Pestisitlerin neden olduğu oksidatif hasarı ortadan kaldırmak ya da azaltmak üzere çeşitli antioksidanların kullanımına yönelik çalışmalar son yıllarda literatürde yerini almaya başlamıştır. Lupeol, günlük diyetle aldığımız beyaz lahana, biber, salatalık ve domates gibi sebzelerde ve zeytin, incir, mango, çilek ve kırmızı üzüm gibi meyvelerde bulunan bir triterpenoitittir. Çeşitli çalışmalarda lupeolün antiinflamatuvar, antitümör, antikanser, antidiyabetik, antimutajenik, kardiyoprotektif ve hepatoprotektif aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızın amacı; çok geniş bir kullanım alanına sahip olan pestisitlerin neden olduğu karaciğer toksisitesini belirleyebilmek, antioksidan özelliği bilinen lupeolün olası koruyucu ve/veya iyileştirici etkilerini gözlemlemek ve insan sağlığını bozabilecek bu durumdan korunmanın yollarına dikkat çekebilmektir. Bu çalışmada deney grupları her bir grupta yedi erkek Wistar albino sıçan olacak şekilde dokuz gruba ayrılmıştır. Kontrol gruplarına sırasıyla serum fizyolojik, 50 mg kg⁻¹ mısır yağı ve 20 mg kg⁻¹ lupeol gavaj yolu ile verilmiştir. Pestisit gruplarına sırasıyla; 50 mg kg⁻¹ malathion, 10 mg kg⁻¹ klorprifoz, 50 mg kg⁻¹ tebukonazol; aynı dozlarda pestisit verilmiş olan diğer üç gruba eş zamanlı olarak oksidatif hasar üstünde iyileştirici ve/veya koruyucu rolünü araştırmak için 20 mg kg⁻¹ lupeol gavaj yolu ile verilmiştir. 10 günün sonunda disekte edilen sıçanlardan histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler için karaciğer dokusu alınmıştır. Bu çalışmanın kapsamında, karaciğerde ortaya çıkan histolojik değişimler hematoksilen-eosin ve Masson'un üçlü boyası uygulanarak ve proliferen hücre nükleer antijeni pozitif hücre sayısı ise immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenerek ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Biyokimyasal metod ile karaciğerde reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonu ve glutatyon düzeyleri; karaciğerde katalaz, süperoksit dismutaz, asetilkolinesteraz aktiviteleri ile serumda asetilkolinesteraz aktiviteleri belirlenmiştir. ELİSA yöntemiyle asetilkolinesteraz ve tümör nekroz faktör- α düzeyleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda, lupeolün, pestisitlerin oluşturduğu hasarı gösteren bütün parametrelerde iyileştirici ve/veya koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, dünyada kullanımı giderek artan pestisitlerin etkisiyle oluşabilecek karaciğer hasarını en aza indirebilmek için lupeolün kullanımının mümkün olabileceğini ilk kez belirleyerek klinik uygulamalara katkı sağladığımızı söyleyebiliriz.

Haziran 2020, 114 sayfa.

Anahtar kelimeler: Organofosforlu pestisit, lupeol, karaciğer, oksidatif hasar, toksikoloji.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE ROLE OF LUPEOL AGAINST PESTICIDES INDUCED OXIDATIVE LIVER DAMAGE

Melis ÇÖREMEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN

With the increasing population, the use of pesticides in agricultural lands is increasing every year to meet the demand for food. Pesticides are chemicals used to control harmful organisms such as some insects and fungi. There are many studies showing that pesticide residues accumulate on fruits and vegetables and this accumulation is well above acceptable limits. Excessive pesticide use causes many environmental problems and threatens human health as well as non-target organisms. It has been reported that the common use of pesticides leads to the earth, water, air pollution, and food contamination by interacting with surfaces contain pesticides. The exposure to pesticides increases when those foods consumed by adults and children through diet. Organophosphorus pesticides are the most widely used group of pesticides in the world today after and organochlorine pesticide Dichloro diphenyl trichloroethane (DDT) was banned. Because the organophosphorus pesticide is a good alternative and easily biodegradable more than organochloride pesticides. However, despite their easy degradability, organophosphorus pesticides have higher acute toxicity, especially on mammals, and result in the death of approximately 100,000 people annually. Also, in case of exposure with pesticides, oxidative stress parameters increase but these mechanisms are not fully understood. For this reason, there are many aspects to be investigated about of metabolism of pesticides. Moreover, it has been stated in many studies that chronic exposure to organophosphorus pesticides can lead to various health problems, such as neurodegenerative disorders and respiratory diseases.

In case of exposure to pesticides, oxidative stress parameters increase and these mechanisms are not fully understood. There are many *in vitro* and *in vivo* studies in the literature regarding oxidative damage showing that it is induced by free radicals as a result of AChE inhibition in the organisms after exposure to organophosphorus pesticides. However, there are many aspects to be investigated about of metabolism of pesticides. There are various experimental studies have been carried out on antioxidants that have healing and protective effects against oxidative damage caused by pesticides. Lupeol is a triterpene found in fruits and vegetables such as white cabbage, fig, mango, strawberry, and concord grape. It has been shown that lupeol has an anti-inflammatory, antimutagenic, anti- cancerogenic, cardioprotective, and hepatoprotective features in various studies.

Our study aims that to determine the liver toxicity caused by pesticides whit a wide range of uses, effects of lupeol that have antioxidant features in terms of liver toxicity, and to draw attention to the ways of protection from this condition that may impair human health. In this study, the male Wistars albino rats were randomly divided into nine groups of seven animals each. Control groups were given saline, 50 mg kg⁻¹ corn oil, and 20 mg kg⁻¹ lupeol via gavage, respectively. Pesticide groups respectively were given 50 mg kg⁻¹ malathion, 10 mg kg⁻¹ chlorpyrifos, and 50 mg kg⁻¹ tebuconazole via gavage. And the other three pesticide groups were given the same doses of pesticide and also 20 mg kg⁻¹ lupeol via gavage to investigate the antioxidant role for ten days. Liver tissue was removed from the dissected rats after exposure and histological, immunohistochemical and biochemical, examinations were performed. Here in this work, under the light microscope, histological changes in the liver were examined by using hematoxylin-eosin and Masson trichome dye and Proliferating cell nuclear antigen positive cell numbers were examined by immunohistochemical methods. Also, liver reactive oxygen species, lipid peroxidation and glutathione levels, catalase, superoxide dismutase, liver, and serum acetylcholinesterase activities were determined by the biochemical method. ELISA was used to determine acetylcholinesterase and tumor necrosis factor- α levels.

It was found out that when lupeol as given with pesticides, lupeol showed healing and protecting effect for all parameters on the damages pesticides caused. As a conclusion, using lupeol to minimize the damage caused by pesticides, which are used worldwide, on the liver was proven for the first time and this finding can make a contribution to clinical studies in the future.

June 2020, 114. pages.

Keywords: Organophosphorus pesticide, lupeol, liver, oxidative damage, toxicology

1. GİRİŞ

Pestisitler, özellikle tarım zararlılarını önlemek veya kontrol altında tutmak amacıyla kullanılan kimyasallardır. Dünya nüfusunun ve gıda ihtiyacının artmasının bir sonucu olarak pestisit kullanımı da küresel ölçekte artış göstermektedir. Pestisit kullanımındaki artış hem çevre kirliliğine sebep olması hem de canlılar üzerindeki olumsuz etkisi sebebiyle kontrol altına alınması gereken bir sorun haline gelmektedir. Pestisit terimi insektisit, herbisit, fungusit, kemirgen ve nematisit öldürücü gibi geniş bir kullanım alanını kapsamaktadır. Sentetik olmayan pestisitler tarih boyunca tarımda verimliliği arttırmak amacıyla kullanılmıştır. Fakat organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin esas olarak kullanımı 2. Dünya Savaşı'na dayanmaktadır (Hamilton ve Crossley, 2004). Pestisit üretimi 20.Yüzyılda en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve üretim 1950 yılında 0,2 milyon ton iken, 2000 yılı itibariyle bu sayı 5 milyon tona kadar yükselmiş bulunmaktadır (Carvalho, 2017). 2017 verilerine göre dünyada pestisit kullanımı kg ha^{-1} olarak hesaplandığında Asya ve Amerika kıtası sırasıyla 3.67 ve 3.57 kg ha^{-1} oranla başı çekmektedir (Faostat, 2017).

Pestisitlerin tarımda yaygın kullanımıyla birlikte bu kimyasal artıkların çevreye yayılması, karasal ve sucul ekosistemlerin dengesini bozmakta, insan sağlığı açısından da ciddi bir tehdite yol açmaktadır (Carvalho, 2017). “Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği”nin 2015 yılında yayınladığı ‘Sistemik Pestisitlerin Biyoçeşitlilik ve Ekosistemler Üzerindeki Etkilerinin Dünya Çapında Bütünleşik Değerlendirmesi’ adlı raporunda, sistemik uygulanan pestisitlerin özellikle tozlaştırıcı canlılar, kara ve su omurgasızları, amfibiler ve kuşlar olmak üzere 1000’den fazla tür için ciddi olumsuz etkilerinin olduğu ifade edilmiştir (Dudley ve diğ., 2017). Birçok araştırma ile herbisitlerin %95’inden ve insektisitlerin ise %98’inden fazlasının hedef organizmalara ulaşmadığı, rüzgar ve akarsular ile uzak alanlara taşınarak çeşitli bitki ve hayvan türleri için tehlike oluşturduğu gösterilmiştir (Pariona, 2017).

Pestisitler ayrıca insan sağlığı açısından da önemli olumsuz etkilere sahiptir. Kanseri, obezite, astım, alerji gibi hastalıklar ile ilişkisi olduğu birçok araştırma ile ortaya konulmuştur (Carvalho, 2017; Hernández ve diğ., 2011; Liu ve diğ., 2015; Kim ve diğ., 2017). Çok düşük dozlara maruziyet durumunda bile özellikle gelişimin erken evrelerinde, doğum kusurlarına ve fetal ölümlere sebep olabilmektedir (Kim ve diğ., 2017). Dünya genelinde her yıl pestisitlerin

yanlış kullanımına bağlı yaklaşık 355.000 kişi hayatını kaybetmektedir (Carvalho, 2017). Organafosforlu pestisitler doğrudan merkezi ve çevresel sinir sistemi üstüne etki etmektedir. Pestisitlere akut veya kronik maruziyet redoks tepkimeleri üstünde olumsuz etkiler yaratıp, birçok organda lipid peroksidasyonuna ve antioksidan kapasitenin azalmasına sebep olmaktadır (Avcı ve diğ., 2018).

Oksidatif stres, doku hasarı ile de oluşabilen, reaktif oksijen türlerinin artmasıyla birlikte dengenin bozulması ve böylelikle antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu meydana gelmektedir. Serbest radikaller eşleşmemiş elektron çiftine sahiptirler ve bu durum onlara aşırı reaktivite kazandırarak DNA, lipidler ve karbonhidratlar gibi önemli makromoleküllerin yapısına zarar vermelerine sebep olur (Kim ve diğ., 2017). Canlı sistemlerde bu oksidatif hasara karşı geliştirilen birçok savunma mekanizması mevcuttur. Bu savunma mekanizmaları enzimatik veya enzimatik olmayan yollardan gerçekleştirilir (Prasad ve diğ., 2008; Yavari ve diğ., 2015). Enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olan lupeol, birçok sebze ve meyvede bulunan antikarsinojen, antiinflamatuvar ve antimutajenik özelliği olan bir triterpen türevidir (Tsai ve diğ., 2016). Lupeol özellikle beyaz lahana, biber, salatalık, domates gibi sebzelerden ve zeytin, incir, mango, çilek, siyah üzüm gibi meyvelerden diyet yoluyla alınmaktadır. Lupeolun, hem *in vitro* (Saleem ve diğ., 2008) hem *in vivo* (Kumari ve Kakkar, 2012) çalışmalarda, çeşitli farmakolojik etkileri olduğu gösterilmiştir (Saleem, 2009). Örneğin bir çalışmada, aflatoksin ile oluşturulan karaciğer hasarında lupeolün söz konusu hasarın giderilmesinde koruyucu rolü olduğu ortaya konulmuştur (Preetha ve diğ., 2006). Bir başka çalışma ile karaciğer hasarı oluşturulan farelerde lupeolün, antioksidan enzimlerden glutatyon (GSH) seviyeleri ve katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazın (GSH-Px) aktivitelerini yükselttiği görülmüştür (Prasad ve diğ., 2007).

Bu tez çalışmasında, pestisitlerin karaciğer dokusunda oluşturduğu histolojik hasarı ve lupeolün bu hasar üzerine olan etkisini belirlemek için, hazırlanan doku kesitleri Hematoksilen-Eozin ile Masson'un üçlü boyası kullanılarak incelenmiştir. Hücre proliferasyonunun saptanması için nötral formalin ile fikse edilen karaciğer dokusuna proliferasyon hücre nükleer antiijeni (PCNA) immünohistokimyası uygulanmıştır. Biyokimyasal yöntemlerle karaciğer reaktif oksijen türleri (ROT), lipid peroksidasyonu (LPO) ve GSH seviyeleri, CAT ve SOD aktiviteleri ile karaciğer ve serum asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri tayin edilmiştir. ELİSA metodu ile AChE ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) düzeyleri ölçülmüştür.

Çalışmada, pestisitlerin etkisiyle oluşan histopatolojik ve biyokimyasal hasarlar ve bu hasarlar üzerinde bir antioksidan olan lupeolün koruyucu etkisinin olup olmadığını *in vivo* deneysel bir modelle ortaya koymak amaçlanmıştır. Çalışmamızın, dünya çapında kullanımı gittikçe artan, pestisitlerin etkileri üzerine yapılan çalışmalara ışık tutabileceğini, böylece lupeolün, insan sağlığını tehdit edecek boyutta kullanılan, çağımızın önemli sorunlarından biri haline gelen pestisit zararlarının tedavisinde uygulanmasına yönelik klinik çalışmalara önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



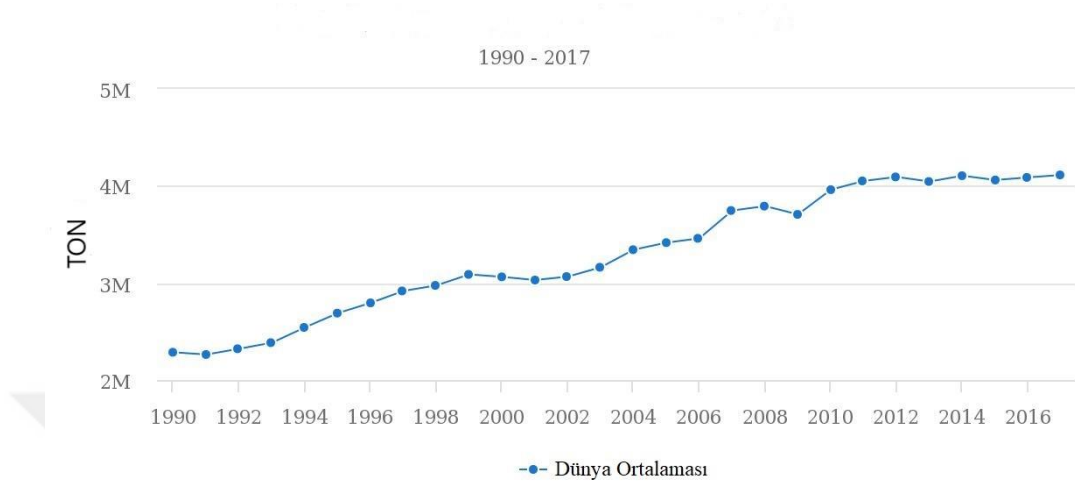
2. GENEL KISIMLAR

2.1. PESTİSİTLER

Pestisitler, tüm dünyada, mahsulün korunmasına yönelik verim artışı ve ucuz maliyeti sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Pan ve diğ., 2018). Tarımda basit bir şekilde uygulanabilir olması ve hızlı etki göstermesi ile ürünü hem zararlılardan hem de yabancı otlardan korumadaki başarısı sayesinde 1940 yılından itibaren pestisitlerin üretimi ve kullanımı giderek artan bir grafik çizmektedir (Tiryaki ve diğ., 2010). Günümüzde pestisit kullanımı dünya çapında yılda 2 milyon tona ulaşmıştır. Bu pazarın büyük bir kısmını Çin oluşturmakta ve onu Amerika Birleşik Devletleri ile Arjantin takip etmektedir. 2020 yılı itibariyle pestisit kullanımının 3,5 milyon tona kadar artış göstereceği tahmin edilmektedir (Sharma ve diğ., 2019).

Tarih boyunca, çeşitli kimyasal maddeler tarımda ürünü korumak amacıyla pestisitlerden çok önce kullanılmaktaydı. Örneğin, Sümerliler 4500 yıl önce böcekleri ve akarları kontrol altında tutmak için kükürt kullanmaktaydılar (Bernardes ve diğ., 2015). 3200 yıl önce Çinliler arsenik ve cıva bileşenlerini vücut bitlerinden korunmak için kullanırlardı (Unsworth, 2010). İlk olarak 1876 yılında sentezlenen dikloro difenil trikloroethan (DDT) ise 2. Dünya Savaşı'ndan sonra yaygın olarak zararlılarla mücadelede kullanılmaya başlandı. DDT başlarda insan sağlığı için zararsız, etkili ve ucuz bir kimyasal olarak gözüktüğünden çok çeşitli varyasyonları da üretildi. 1962 yılında Rachel Carson yazdığı “Silent Spring” isimli kitabında DDT’nin hem çevre hem de insan için zararlarından bahsederek, DDT kullanımının kısıtlanmasına dair toplumda bir bilinç oluşturdu. 1967 yılında kuş yumurtalarının kabuklarındaki çabuk kırılma ve incelmanın DDT kullanımıyla doğrudan ilişkili olduğu İngiliz bir araştırmacı tarafından kanıtlandı. DDT’nin hedef organizmalar haricinde kuşlar ve balıklar üzerindeki olumsuz etkileri, ekosistemdeki kalıcılığının yüksek olması gibi zararlı etkileri göz önünde bulundurularak 1972 yılında Birleşik Devletlerde ve sonrasında diğer ülkelerde DDT kullanımı yasaklanmaya başlandı (Bernardes ve diğ., 2015). Sonradan yapılan çeşitli araştırmalar ile DDT’nin akut ve kronik maruziyetinin, bireylerde meme kanseri riskini arttırdığı, ayrıca diyabet ve karaciğer hastalıklarına sebep olduğu gösterilmiştir (Tang ve diğ., 2014; Li ve diğ., 2017). DDT’nin bu zararlı etkileri göz önünde bulundurularak daha seçici ve daha güvenli yeni pestisitlerin üretilmesi için çalışmalar başlatıldı, böylelikle organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid türevi sentetik pestisitler ortaya çıkmıştır (Bernardes ve diğ., 2015; McAfee, 2017). Günümüzde dünya

genelinde kullanılan pestisit çeşidinin 2000'den fazla olduğu bilinmektedir (Wang ve diğ., 2019).



Şekil 2. 1: Pestisit kullanımının yıllara göre değişim grafiği (Fao, 2017)

Pestisit kullanımının halk sağlığı ve çevre için doğurabileceği zararlar birçok araştırma ile ortaya konulmuştur. Fakat bununla birlikte, pestisitler olmadan gıda üretimi düşüş gösterecek, gıda fiyatlarında artış meydana gelecek ve ürün miktarındaki bu kaybı önlemek için daha fazla dikili tarım alanlarına gereksinim olacaktır (Bernardes ve diğ., 2015). Ayrıca, bazı araştırmacılar taze meyve ve sebze tüketmenin faydasının, tüketilen bu gıdalardaki pestisit kalıntılarının yaratacağı riskten, daha fazla olduğunu düşünmektedirler. Bunun yanı sıra pestisitler, insanlar için bulaşıcı hastalık yapan organizmaları etkisiz hale getirmek konusunda da önemli bir rol oynamaktadır (Maksymiv, 2015). Pestisitler, ürünlerin iyileştirilmesi ve bulaşıcı hastalıkların kontrolünde kullanışlı gözükse bile, uzun süreli maruziyette hem çevreye hem insan sağlığına dönük olumsuz etkiler yaratmaktadırlar. Bu kimyasallar ekosistemde birikim gösteren, stabil ve toksik maddelerdir. Bu sebeple aşırı kullanımı bir takım olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir. Pestisitlerin ilk kullanımında, hedef canlıların popülasyonunda ciddi bir azalma gözlenir; fakat ileriki zamanlarda pestisite karşı direnç gösteren bu canlıların popülasyonu giderek artar ve nihayetinde uygulanan pestisit etkisiz hale gelir. Örneğin, 1970'li yıllarda Meksika'da bir pamuk tarlasında kurtlara karşı uygulanan pestisitin en sonunda inaktifleşmesi sonucu, ürünü korumanın bir yolu kalmayınca 285,000 hektar alana sahip tarla terkedilmiştir (Wilson ve Tisdell, 2001). Doğrudan veya dolaylı olarak havaya, suya ve toprağa

karışan pestisitler tüm ekosistemde canlılar için ciddi sağlık problemleri oluşturabilmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, pestisitlerin birçok organın yapısal fonksiyonunu bozarak, endokrin, sinir ve üreme sistemlerini olumsuz yönde etkilediği, nörodejeneratif hastalıklar ve gelişim bozukluklarına sebep olduğu görülmektedir (Mostafalou ve Abdollahi, 2013; Sharma ve diğ., 2019).

19. Yüzyılın ortalarından bu yana sanayinin gelişmesiyle birlikte pestisit kullanımındaki yükseliş, beraberinde ekolojik dengenin korunmasına dönük kaygılara yol açmaktadır. Biyoçeşitliliğin olumsuz etkilenmesi, gıda güvenliğinin azalması ve su kaynaklarının kirlenmesine dönük kaygılar pestisit kullanımının yol açtığı önemli problemlerin sonucudur (Özkara ve diğ., 2016). Pestisit kalıntısıyla kontamine olan toprak yüzeyi, bazı pestisitlerin kalıcılığının yüksek olması ve hedef olmayan organizmalara toksik etkisi gibi sebepler gittikçe daha da artan bir endişe yaratmaktadır. 2015 yılında Avrupa Birliği üyesi 11 ülkeden toplanan 375 toprak örneği incelenmiş ve %80'den fazla örnekte pestisit kalıntılarına rastlanmıştır (Silva ve diğ., 2019). Pestisitlerin uygulandığı topraktaki adsorpsiyon dereceleri toprağın çeşidine, uygulanan pestisit molekül yapısı, boyut, şekil, çözünürlük, polarite gibi özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir (Gevao ve diğ., 2000). Ayrıca pestisit kalıntıları besin zinciri yoluyla taşınabilmekte ve kümes hayvanlarından balıklara, bitkisel yağlardan çeşitli meyve ve sebzelere kadar birçok üründe tespit edilebilmektedir (Grewal ve diğ., 2017). Polonya'da yapılan bir çalışmada 547 meyve ve 479 sebze örneği üzerinde pestisit kalıntıları incelenmiş ve sonuçlara göre incelenen meyve örneklerinin 277'sinde (%50,6) ve sebze örneklerinin 99'unda (%20,7)'unda pestisit kalıntılarına rastlanılmıştır. Pestisit kalıntılarının en çok biriktiği meyveler; siyah kuşüzümü (%48,6), üzüm (%50), elma (%61,9), Bektaş üzümü (%66,7), ve sebzeler de; tatlı biber (%55,6), domates (%59,5), kereviz (%62,5) olarak belirlenmiştir (Szpyrka ve diğ., 2015). Belçika'da yapılan benzer bir çalışmada ölçüm yapılan 1413 adet meyve ve sebze örneğinin %72'sinde pestisit kalıntısına rastlanılmış ve %6'sının standart değerleri aştığı gösterilmiştir (Claeys ve diğ., 2011).

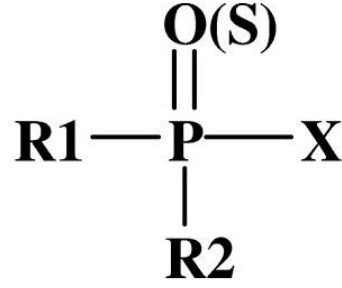
Pestisitler çeşitli yollarla yeraltı su kaynakları, göller ve akarsulara ulaşarak tatlı su kaynaklarını kontamine etmekte ve dolayısıyla buradaki biyoçeşitliliği tehlike altına sokmaktadır (Lorenz ve diğ., 2017). Hem yüzeyde hem de yeraltı sularında oluşan pestisit kirliliği buradaki faunayı, bitki örtüsünü ve bu suyu kullanan insan sağlığını etkileyebilmektedir (Maksymiv, 2015).

Pestisitlerin su ve toprak kirliliğine sebep olması sadece gıda güvenliğini bozmakla kalmayıp insan sağlığını da tehdit etmektedir. Pestisit uygulamalarından direkt olarak etkilenen en önemli meslek grubu çiftçiler olup, yapılan çeşitli çalışmalarla pestisitlerin bu bireylerde kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarı ve oksidatif stres seviyesinde artışa, serum asetilkolinesteraz aktivitesinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Atherton ve diğ., 2009; Remor ve diğ., 2009). Yapılan deneysel çalışmalar ve epidemiyolojik araştırmalar pestisitlerin karsinojenik etkisi olduğunu özellikle prostat, akciğer ve lösemi kanseriyle bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır (Blair ve diğ., 2015).

Pestisitlerin gruplandırılması çeşitli yollarla yapılabilmektedir. Bunlardan biri kimyasal yapılarına göre gruplandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre; organofosforlu (klorprifoz, diazinon), organoklorlu (DDT, aldrin), karbamatlı (aldicarb) ve pretroit (sipermetrin) grubu pestisitler olarak ayrılırlar. Benzer kimyasal özelliklere sahip pestisitler, ekosistemde kalıcılık ve taşınım ile toksisite mekanizmasında benzer özellik sergilerler. Ayrıca pestisitleri, kontrol ettikleri canlı türüne göre sınıflandırmak da mümkündür. Örneğin insektisitler böceklere karşı korumada etkiliyken, herbisitler bitki ve yabani otlara, fungusitler mantarlara karşı, rodensitler de kemirgenlerle mücadelede tercih edilmektedirler (Bernardes ve diğ., 2015).

2.1.1. Organofosforlu Pestisitler

Organofosforlu pestisitler (OP), ilk elde edilişi iki yüzyıl öncesine dayansa da özellikle II. Dünya Savaşından sonra ünlenmiş ve şu anda dünyada en çok kullanılan pestisit grupları arasında yerini almıştır (Costa, 2017). Özellikle organik klorlu pestisitlerle kıyaslandığında organizma üzerinde daha az toksik etkilere sahip olması ve doğada kalıcılığının altı ay gibi kısa bir süre olması sebebiyle sıkça tercih edilmeye başlanmıştır (Reynoso ve diğ., 2019). OP'lerin Schrader tarafından 1937 yılında genel yapıları ortaya konulmuştur. Bir fosfor, sülfür ya da oksijen atomuyla çift bağ kurmakta, yan gruplar ise genelde alkoksi gruplarından oluşmaktadır (Costa, 2017).



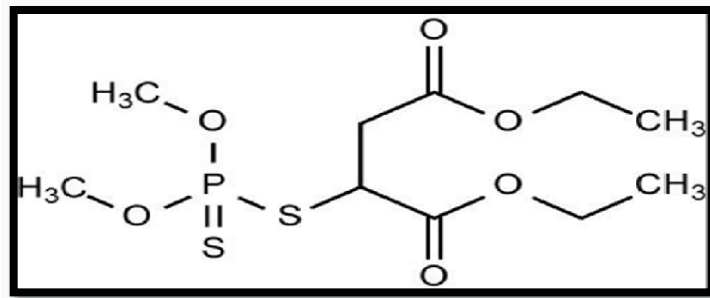
Şekil 2. 2: Organofosforlu pestisitlerin genel kimyasal formülü

Organofosforlu pestisitlerin ana çalışma mekanizması AChE enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe etmektir. AChE, bir nörotransmitter olan asetilkolinin yıkımından sorumlu; nöromuskular kavşakta, kolinerjik nöronlarda ve kırmızı kan hücrelerinde bulunan 537 polipeptid uzunluğunda sinir sisteminin en önemli enzimlerindendir (Costa, 2017). Asetilkolin, asetil koenzim A ve kolinden meydana gelmektedir ve AChE, asetilkolinin, asetatla koline hidrolizini sağlamaktadır. Sinaptik boşlukta salgılanan asetilkolin, muskarinik ve nikotinik reseptörlere bağlanarak kas hücresinin depolarizasyonunu sağlamaktadır. Organik fosforlu pestisitler, asetilkolinesterazın aktif bölgesindeki serin aminoasidinin hidroksil grubundaki oksijeni fosforilleyerek enzimi etkisiz hale getirmektedirler. Fakat bu noktada enzim hala bir oksim grubu ile aktif hale döndürülebilmektedir. Eğer fosforillenme olduktan sonra bu aşamayı bir alkil grubunun ayrılması takip ederse enzim artık geri dönüşümsüz şekilde inhibe olmaktadır ve bu süreç yaşlanma olarak adlandırılmaktadır (Costa, 2017; Lorke ve Petroianu, 2019). Asetilkolinesterazın inhibe olmasıyla birlikte asetilkolinin yıkılamaması sonucu asetilkolin, kolinerjik sinapslarda birikmektedir ve nöronlarda aşırı uyarılmaya sebep olmaktadır. Kolinerjik sendrom veya kolinerjik kriz adı verilen bu durum da terleme, tükürük ve bronşial salgıda artış, hipertansiyon, kusma ve karında kramp ile solunum yolunun felç olmasına kadar geniş spektrumda komplikasyonlara sebep olmaktadır (Lorke ve Petroianu, 2019). Organofosforlu pestisitlere gastrointestinal, solunum veya dermal yolla maruz kalınabilmektedir. Pestisitlere en fazla maruz kalan meslek gruplarını tarım çalışanları, çiftçiler ve pestisit ilaçlaması yapan işçiler oluşturmaktadır. Bu meslek grupları arasında yapılan epidemiyolojik çalışmalarda pestisite maruziyet sonucunda periferik sinir sisteminde hasar, anksiyete ve depresyon ile nöropsikolojik bozulmalar görülebilmektedir (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Jkanović, 2018). Malathion, klorprifoz ve diklorpozun dahil olduğu organik fosforlu pestisitler beyinde antioksidan ve pro-oksidan dengesini bozarak oksidatif stresi

arttırmaktadır. Oksidatif stresin oluşumunda rol oynayan reaktif oksijen türleri, apoptotik ve anti-apoptotik protein miktarlarında dengesizliğe, mitokondriyal membran değişimine ve sitokrom C salınımına sebep olabilmektedir. Artmış oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu Alzheimer hastalığında görülen amiloid beta birikimine, seramid üretiminin başlamasına ve apoptozu uyaran JNK, ERK1/2, MAP kinaz ifadelerinin değişmesine neden olmaktadır (Yadav ve diğ., 2016). Cache County çalışması pestisitlere maruziyet ile Alzheimer hastalığı arasındaki ilişkiyi aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalardan birisidir. ABD Utah'da Cache tarım ilçesinde yaşayan 5092 katılımcı, pestisite maruz kalan ve kalmayan bireyler olarak sınıflandırıldı. Maruz kalınan pestisit çeşidi belirlendi. Deney katılımcıları üç, yedi ve on yıl arayla bilişsel işlevlerin değerlendirildiği teste tabii tutuldular. Sonuçlar, demans ve Alzheimer hastalığının pestisite maruz kalan gruplarda anlamlı şekilde artış olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ayrıca Alzheimer hastalığına yakalanma riskinin organofosforlu pestisite maruz kalanlarda, organoklorlu pestisite maruz kalanlara göre, daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Hayden ve diğ., 2010; Zaganas ve diğ., 2013).

2.1.1.1. Malathion

Malathion, Diethyl 2-[(dimethoxyphosphorothioyl)sulfanyl] butanedioate geniş spektrumlu organofosfat grubu bir insektisit olup ilk olarak 1956 yılında onaylanmıştır. Malathion renksiz veya kehribar rengine, su, alkol, ester ve ketonda kolayca çözünen bir kimyasaldır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği (IARC) kayıtlarına göre, olası karsinogen (grup 2A) sınıfında bulunmaktadır. Malaoxon, malathionun parçalanma ürünü olup malathiondan çok daha toksiktir ve kolinesterazların inhibisyonuna sebep olmaktadır (Edwards, 2006).

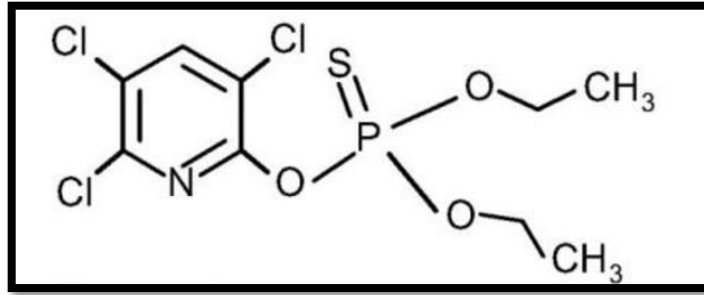


Şekil 2. 3: Malathionun kimyasal yapısı

Malathionun farelere üç farklı doz verildiği bir çalışmada (2.5, 5 ve 10 mg kg⁻¹) kemik iliğinde, verilen dozla doğru orantılı olarak kromozom aberasyonlarında artış olduğu saptanmıştır (Giri ve diğ., 2002). Yapılan başka bir çalışmada ise 90 gün boyunca oral yolla 50 mg kg⁻¹ malathion verilen sıçanlarda serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrogenaz (LDH) değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu enzimlerin yüksekliği karaciğer hasarının göstergesi olmakla birlikte histopatolojik bulgular da bu durumu desteklemektedir (Aboubakr ve diğ., 2019).

2.1.1.2. Klorprifoz

Klorprifoz, O,O-Diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate, organofosfat grubu bir pestisit olup, patenti 1966 yılında “Dow Chemical Company” tarafından alınmıştır. Klorprifoz, renksiz veya beyaz renkli, merkaptan benzeri kokuya sahip, kristal katı kıvamda sudaki çözünürlüğü az, organik bileşiklerde ise kolayca çözünen bir yapıya sahiptir (Eaton ve diğ., 2008). Klorprifoz-oxon, klorprifozun parçalanma ürünüdür ve kolinesterazların inhibisyonuna sebep olur. Klorprifozun genotoksik, immünotoksik ve nörotoksik etkisi yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Sharma ve diğ., 2019; Mahmoud ve diğ. 2019).

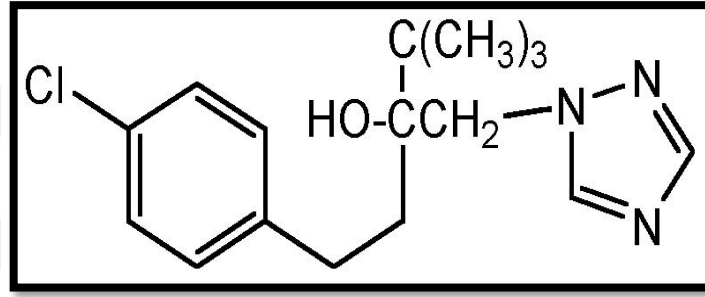


Şekil 2. 4: Klorprifozun kimyasal yapısı

Rohlman ve Ismail'in (2019) Mısır'da 12-21 yaş arasında pestisit uygulaması yapan işçiler üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite bozukluğu ile klorprifoz uygulaması arasında korelasyon olduğu saptanmıştır. Yapılan çeşitli araştırmalar ile klorprifoz maruziyetinin depresyon ve anksiyete ile doğru orantılı olduğu gösterilmektedir (Chen ve diğ., 2011).

2.1.1.3. Tebukonazol

Tebukonazol, 1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol, tarımda meyve ve sebzeleri mantar kontaminasyonuna karşı korumak için sıklıkla kullanılan triazol grubu bir fungusittir. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı'na (EPA) göre insan sağlığı için olası karsinojen kimyasallar sınıfında bulunmaktadır. Tebukonazol, mantarların hücre zarında bulunan bir sterol olan ergosterolün sentezini engeller. Aerobik koşullar altında topraktaki yarılanma ömrü 49-610 gün arasında değişmektedir ve topraktaki hareketliliği orta derecededir (Želonková ve diğ., 2019).



Şekil 2. 5: Tebukonazolün kimyasal yapısı.

Yang ve diğ. (2018) yaptıkları bir çalışmada; tebukonazolün SOD aktivitesini sıçan karaciğer, böbrek ve testis dokularında arttırdığı, glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesini ise karaciğer ve böbrek dokusunda artırırken, testis dokusunda azalttığı saptanmıştır. Sırasıyla 50 mg kg⁻¹ ve 100 mg kg⁻¹ tebukonazol maruziyetine bırakılmış hamile sıçanlar arasında yapılan bir başka çalışma ile, hamileliğin 21. gününde fetal testis testesteron seviyelerinde düşüş ve erkek sıçanlarda dişileşme görüldüğü tespit edilmiştir (Taxvig ve diğ., 2007).

2.2. SERBEST RADİKALLER VE OKSİDATİF HASAR

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren, bu yüzden kararsız yapıda bulunan ve kararlı hale geçebilmek için diğer organik bileşiklerle reaksiyona girme eğiliminde olan aşırı reaktif atom veya moleküllerdir. En basit serbest radikale, tek bir elektrona sahip hidrojen (H) atomu örnek olarak verilebilir. Çok kısa yarılanma ömürleri olduğundan serbest radikalleri sentezlemek, depolamak, dolayısıyla onların biyokimyasal ve patofizyolojik süreçlere katılımlarını anlamaya çalışmak, oldukça zordur (Laher, 2014).

Serbest radikallerin meydana gelmesi çeşitli yollarla olabilir. Örneğin radikal olmayan bir molekülün bir elektron kazanması ($Y + e^- \rightarrow Y\bullet$) veya kaybetmesi ($X - e^- \rightarrow X\bullet$) yani eşlenmemiş bir elektrona sahip olmasıyla meydana gelebilir. Ayrıca bir moleküldeki kovalent bağın kırılması (homolitik bölünme) ile paylaşılan elektronlardan her birinin bir atoma gitmesi ($X : Y \rightarrow X\bullet + Y\bullet$) ile yine eşlenmemiş bir elektrona sahip radikaller oluşur. Bir moleküldeki kovalent bağ kırıldığında her iki elektronda aynı atoma gelirse ($X : Y \rightarrow X^- + Y^+$), buna da heterolitik bölünme adı verilir. Bu durumda iki yeni reaktif oluşmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Serbest radikaller, oksijen kaynaklı meydana geliyorsa reaktif oksijen türleri (ROT), nitrojenden meydana geliyorsa reaktif nitrojen türleri (RNS) adını almaktadır. Oksijen kaynaklı radikaller için peroksil ($ROO\bullet$), hidroksil ($OH\bullet$), alkoksil ($RO\bullet$) ve süperoksit anyonu (O_2^-); nitrojen kaynaklı radikaller için de nitrik oksit ($NO\bullet$) ile azot dioksit ($NO_2\bullet$) örnek verilebilir. Bunların yanında hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest radikal olmadığı halde, en reaktif serbest radikal olan $OH\bullet$ 'i oluşturma özelliğinden dolayı reaktif oksijen türevi olarak kabul edilir (Halliwell ve Whiteman, 2004). Serbest radikaller canlılar için sadece zararlı etkilere sahip değildir; aynı zamanda canlılığın kökeni ve evrimi için de önemli rollere sahiptir. Oksijen radikalleri, sinyal iletimi ve gen transkripsiyonunda rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinde üretilen nitrik oksit ise düz kas hücrelerinin gevşemesi, lökositlerin adezyonu için gerekliken, aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilen nitrik oksit bağışıklık yanıtın oluşması için önemlidir (Fang ve diğ., 2002). Serbest radikallerin bilinen bu faydalarının yanı sıra canlılarda belirli bir düzeyin üstüne çıkması proteinler, lipitler ve DNA'nın yapısını bozarak tehlikeli sonuçlar doğurabilmekte ve canlılarda birçok hastalığın temelini oluşturmaktadır. Serbest radikaller, enzimlerde aktivite kaybına, DNA'da meydana getirdiği değişiklikler ile mutasyona ve kansere sebep olabilmektedir. Lipitler ise serbest radikallerden en çok etkilenen makromoleküllerdir (Devasagayam ve diğ., 2004).

Lipitlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin C-H (metilen) grubunun oksijen ile yükseltgenerek bozulmasıyla lipit peroksidasyonu (LPO) gerçekleşir ve etan, alkol, aldehit veya pentan gibi yan ürünler oluşur. (Devasagayam ve diğ., 2004). Başlama, gelişme ve sonlanma olarak üç aşamada gerçekleşen lipit peroksidasyonunun ilk aşamasında, bir yağ asidinden hidrojen atomu koparak karbon merkezli reaktif lipitler ($L\bullet$) meydana gelir. Stabil olmayan bu reaktif lipit, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipit peroksit radikallerini ($LOO\bullet$) oluşturur. Oluşan bu lipit peroksit radikalleri de yeni reaktif lipitleri meydana getirir ve

böylece zincirleme bir reaksiyon oluşmuş olur. Lipit peroksil radikallerine H^+ eklenmesi ile oluşan lipidhidroperoksit'in yıkımı ile özellikle lipit peroksidasyonunun önemli belirteci sayılan malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-e-nonenal (HNE), akrolein gibi sekonder ürünler oluşmaktadır (Marnet, 1999).

LPO ürünleri ve özellikle oksitlenmiş lipitlerden oluşan aldehitler ROT'a göre çok daha kararlı yapıdadır. Bu nedenle hücrede üretildiği yerden uzak bölgelere yayılarak hasarı genişletebilir. LPO ürünlerinin proteinlerle oluşturduğu eklentiler, hücrede sinyal yollarının bozulması, protein ve DNA hasarı gibi biyolojik etkilere sebep olabilmektedir. ROT ve sekonder ürünlerin oluşturduğu bu hasara oksidatif hasar denmektedir. Halliwell ve Whiteman (2004) oksidatif hasarı, canlı organizmaların bileşenlerine ROT saldırısının neden olduğu biyomoleküler hasar olarak tanımlamıştır. Alzheimer, kanser, kalp yetmezliği ve immünolojik bozukluklarda hücre içinde artmış LPO ürünleri gözlenmiştir; bunlar oksidatif hasarın sebep olduğu düşünülen hastalıklardan sadece birkaçıdır (Ramana ve diğ., 2013; Geçotek ve Skrzydlewska, 2019).

2.3. ANTIOKSİDAN SİSTEM

Antioksidanlar, hücrede serbest radikallerin ve reaktif metabolitlerin meydana getirdiği toksik etkileri engelleyen veya ortadan kaldıran, canlının savunma mekanizmasının bir parçasıdır. Antioksidanları birincil, sekonder, endojen, eksojen, enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlar olarak etkileşim şekline göre sınıflandırmak mümkündür (Shivakumar ve Yogendra, 2018). Eksojen antioksidanlar arasında vitamin E, vitamin C, folik asit, ve β -karoten gibi özellikle sebze ve meyvelerden diyet yoluyla alınan vitaminler sayılabilir. Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik olan antioksidanlar; süperoksit radikalinin katalizinden sorumlu SOD ve hidrojen peroksitin parçalanmasından sorumlu CAT ile GSH-Px enzimleridir. Enzimatik olmayan antioksidanlardan en önemlisi serbest radikallerle doğrudan reaksiyona girerek oksidatif hasarın engellenmesini sağlayan GSH'dir (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016).

Antioksidan sistem, vücutta üretilen reaktif oksijen türlerinin verdiği zararı önlemeye çalışarak veya ortadan kaldırarak oksidan-antioksidan sistem arasındaki dengenin kurulmasında önemli rollere sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar, antioksidanların oksidatif stresin yol açtığı kanser,

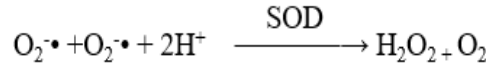
nörodejeneratif hastalıklar ve DNA mutasyonu gibi hücre içindeki hasarı azalttığını göstermektedir (Pisoschi ve Pop, 2015).

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, oksidanları daha az toksik moleküllere çevirerek ortamdan uzaklaştıran SOD, GSH-Px ve CAT gibi hücrede üretilen enzimlerdir.

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz

İlk olarak sığır eritrositlerinde tanımlanan ve insanlarda üç farklı izoformu olan SOD bütün aerobik organizmalarda bulunan bir metalloproteindir. Hücre içinde sitozolde bulunan SOD, Cu (bakır) ve Zn (çinko) içeren bir aktif bölge ve ayrıca iki alt birime sahip en yaygın bulunan formdur. Hücre dışında plazmada bulunan SOD sadece Cu, mitokondride lokalize olan SOD ise manganez (Mn) içerir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).



Superoksit anyon radikalının ($\text{O}_2^{\cdot-}$) katalitik olarak uzaklaştırılmasında etkili olan SOD, birer molekül $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 olarak radikal olmayan moleküllere parçalanmasını sağlar.

2.3.1.2. Katalaz

Katalaz birkaç bakteri ve alg türü haricindeki bütün aerobik canlılarda bulunur. Hayvanların özellikle karaciğer ve eritrositlerinde bulunan katalaz, hücre içinde peroksizomlarda lokalize olmaktadır. Katalaz dört alt birimden oluşmaktadır ve her alt birim aktif bölgesinde demir (Fe^{+2}) içermektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).



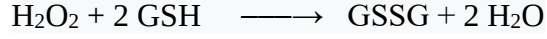
Katalaz oksidatif bir ajan olan ve hücre için toksik etki yaratan hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasını sağlar.

2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px şu ana kadar tanımlanmış sekiz farklı izoformu bulunan çoğunlukla sitozolde ve bazen mitokondride konumlanan bir antioksidandır. GSH-Px dört alt birimin her biri bir selenyum (Se) atomu içeren, selenyum bağımlı bir selenoenzimdir. Selenyum bağımlı olmayan GSHPx

çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan ve organik hidroperoksitlerin yıkımından sorumludur (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

GPx



Selenyum bağımlı GSH-Px hidrojen peroksit başta olmak üzere hidroperoksitlerin alkol ve suya ayrışmasını sağlar. Lipid hidroperoksitlerine de etki ederek lipidleri peroksidasyondan koruyan önemli bir enzimdir.

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında en önemlisi glutatyon olmakla birlikte melatonin, albümin, ürik asit ve çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan lupeol (Nagaraj ve diğ., 2000) sayılabilir.

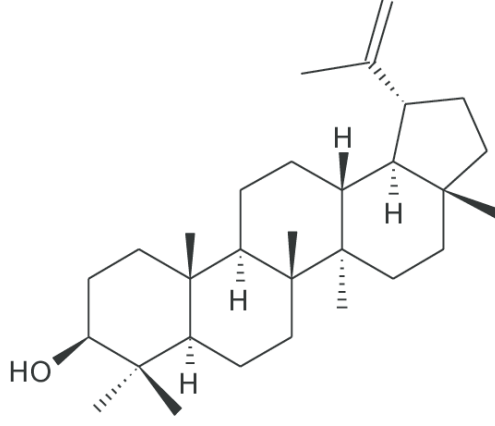
2.3.2.1. Glutatyon

Bütün ökaryotik ve bazı prokaryotik hücrelerde bulunan, glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelen tripeptid antioksidandır. Glutatyonun; askorbat metabolizmasının düzenlenmesi, proteinlerin katlanması, proteinlerin sülfidril gruplarının oksitlenmesinin ve çapraz bağlanmasının önlenmesi, GSH-Px ve GST enzimleri için kofaktör görevi görmesi ve dolayısıyla antioksidan etki göstermesi gibi hücre içinde önemli rolleri bulunur.

2.3.2.2. Lupeol

Lupeol, kapalı formülü $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ olan anti-inflamatuar (Geetha ve Varalakshmi, 2001), antioksidan (Gupta ve diğ., 2012), anti-diyabetik (Gupta ve diğ., 2012) ve karaciğer koruyucu (Preetha ve diğ., 2006) etkisi gösterilmiş bir triterpen türevidir. Lupeol özellikle beyaz lahana, domates, mango, çilek, soya fasulyesi ve salatalık gibi çeşitli meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Son yıllarda, kinikte kullanımı için giderek artan bir ilgiyle terapötik etkileri üstüne araştırmalar yapılmaktadır (Saleem, 2009). Tchimene ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP), Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (ABTS) gibi antioksidanların etkilerinin belirlenmesinde kullanılan testleri uygulayarak, lupeolün, serbest radikalleri ortamdan

uzaklaştırdığını, lipid peroksidasyonunu azalttığını ve endojen antioksidan seviyelerinde artış meydana getirdiğini göstererek, antioksidan özelliğini kanıtlanmışlardır.



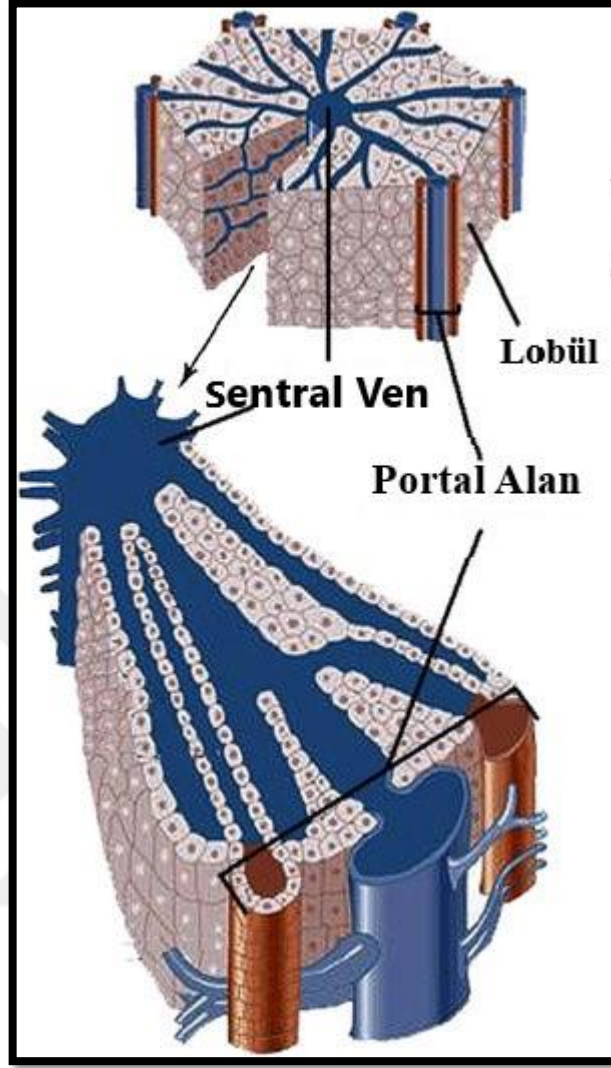
Şekil 2. 6 : Lupeolün kimyasal yapısı.

Lupeolün hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullar altındaki etkileri birçok çalışmada ele alınmıştır. *In vitro* yapılan çalışmalar sonucu, lupeolün hepatokarsinom hücrelerinde mitokondriye bağımlı yolla apoptozu indüklediği ve kanser tedavilerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Li ve Xiao, 2018; Shen ve diğ., 2019). ALT ve AST enzimleri sağlıklı bireylerde kan serumunda düşük düzeylerde seyreden karaciğer enzimleridir. Preetha ve diğ. (2006) yaptıkları bir çalışmada lupeol ile ön muameleden sonra aflatoxin verilen sıçanlarda karaciğer hasarının göstergesi olan serum ALT ve AST enzim düzeylerinde ciddi bir düşüş görüldüğünü ve lupeolün karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte lupeolün diyabetik sıçanlarda insülin seviyelerini düzenleyerek kan glukozu düzeyini düşürdüğü, anti-hiperglisemik ve antioksidan etkisi olduğu saptanmıştır (Ramu ve diğ., 2016).

2.4. KARACİĞER

Karaciğer, yetişkin bir insanda 1300-1700 gram (g) arasında değişen bir ağırlığa sahip olup, diyaframın hemen altında karın boşluğunun sağ üst kısmında bulunmaktadır ve vücutta birçok fizyolojik olayın gerçekleştiği hayati bir organdır (Trefts ve diğ., 2017). Karaciğer, serum proteinlerinin sentezi, aminoasit, lipid ve karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi ve

detoksifikasyon işlemleri gibi başlıca görevlere sahiptir. Dört adet lobdan oluşan karaciğer periton ile kaplıdır, bunun altında ince bir bağ dokusundan oluşan, elastik ve kollejen lifler içeren Glisson kapsülü bulunur (Kierszenbaum, 2006). Hepatik lobüller karaciğerin en küçük işlevsel birimleri olup altıgen şeklinde bir yapıya sahiptirler. Altıgenin her köşesinde, bir safra kanalı, bir hepatik arter ve bir portal venden oluşan portal bölge bulunur. Altı adet portal bölgenin ortasında bir merkezi ven bulunur. Karaciğere hepatik arter ve portal venden giren kan karaciğer sinüzoidlerinden geçerek merkezi vene doğru akar (Duncan ve diğ., 2009). Portal ven karaciğere aminoasit, karbonhidrat ve diğer sindirim besinleri açısından zengin fakat oksijen açısından fakir kan taşımaktadır. Karaciğerin oksijen gereksinimi ise hepatik arter vasıtasıyla karşılanmaktadır (Young ve diğ., 2013). Karaciğer hepatik lobülünde hepatik artere yakın kısım, Zon 1 olarak adlandırılıp, oksijen ve besin açısından zengin bölgeyi oluşturur. Merkezi venin çevresini Zon 3 oluşturur ve oksijen bakımından en fakir bölgedir. Zon 2 ise bu iki bölgenin arasında kalan kısımdan oluşur (Mescher ve Junqueira, 2018).



Şekil 2. 7: Karaciğer lobülü genel görünümü (Guleç ve diğ., 2010)

Karaciğerde başlıca dört hücre grubu bulunur. Biyosentezden sorumlu ve karaciğerin %70-80'ini oluşturan hücre grubu hepatositlerdir. Karaciğerin endotel hücreleri ise sinüzoidlerin duvarını döşeyen ve kan ile hepatositler arasında bariyer görevi gören hücrelerdir. Karaciğerin diğer iki hücresi; makrofaj görevi gören Kupffer hücreleri ve A vitamini ile lipid depolayan karaciğer yıldız hücreleridir (Carrero ve Piñeiro, 2004).

Karaciğer hepatositlerine gen ekspresyonu ve biyokimyasal aktivite açısından bakıldığında bütün hepatositlerin fonksiyonunun aynı olmadığı saptanmıştır. Hepatositlerin, hepatik lobül içinde bulundukları fiziksel konuma göre farklı işlevlere sahip oldukları gösterilmiştir. Portal bölgeye bitişik bulunan hepatositler, üre döngüsünde kullanılan enzimleri salgılar ve amonyağı

üreye dönüştürürken; merkezi vene yakın bölgede bulunan hepatositler glutamin sentazı eksprese ederek glutamin oluşturmak amacıyla amonyak kullanırlar (Duncan ve diğ., 2009).

Karaciğerin en önemli görevlerinden biri, canlının her gün maruz kaldığı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonudur. Bu detoksifikasyon işlemi karaciğerde iki aşamada gerçekleşir. Faz 1 olarak adlandırılan ilk basamakta, sitokrom P450 proteinleri olarak adlandırılan hem grubu (demirli-porfirin) içeren enzimler rol alır. Faz 1 reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz olarak özetlenebilir. Faz 1 aşamasında meydana gelen metabolitler ana molekülden daha toksik olabilir. Faz 1 aşamasında meydana gelen bu ara moleküllerin, Faz 2 aşamasında metilasyon, asetilasyon veya glutatyon konjugasyonu ile suda çözünür formu oluşturularak vücuttan atılımı sağlanır. Faz 2 için detoksifikasyon aşaması da denilebilir. İlaçlar ve çevresel toksik maddeler, karaciğerdeki toksik metabolitlerin üretimi ve detoksifikasyon arasındaki dengenin bozulmasına, bunun sonucunda karaciğer toksisitesine sebep olabilir (Piñeiro-Carrero ve Piñeiro, 2014).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HAYVANLARIN TEMİNİ

Çalışmamıza “Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu” nun 26.10.2018 tarih ve 2018/248 sayılı kararı ile etik kurul onayı verilmiş ve çalışma süresince Etik Kurul ilkelerine bağlı kalınmıştır. Çalışmada kullanılan ve ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen 8-10 haftalık 63 adet *Wistar albino* türü yetişkin erkek sıçan, “İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü” tarafından temin edilmiştir. Tüm deney süreci “Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi”nde tamamlanmıştır. Deney öncesinde sıçanlar, yeni ortam koşullarına alışabilmeleri için 1 hafta boyunca karantinada tutulmuşlardır. Sıçanlar hem alıştırma periyodu hem de deney süresince kontrollü laboratuvar şartlarında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık fotoperiyodu, 22 ± 2 °C sabit sıcaklık, %50-60 nem oranının olduğu laboratuvar ortamında şehir suyu ve standart pellet yem ile beslenmişlerdir. Deney süreci başlamadan önce bütün sıçanların ağırlıkları tartılmıştır.

Antioksidan olarak kullandığımız Lupeol, Carbosynth Ltd. (Birleşik Krallık) ve kullanılan pestisitler ticari ürün olup; Malathion Agrofarm A.Ş.(Türkiye), klorprifoz Safa Tarım (Türkiye) ve tebukonazol Agrofarm A.Ş. (Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

3.1.1. Deney Protokolü

Lupeol ve pestisitler günlük olarak hazırlanan ana stoktan hayvanın ağırlığına göre hesaplanarak gavaj yolu ile verilmiştir. Ana stok; 15 ml mısır yağında 0,24 g lupeol, 30 ml mısır yağında 0,24 g klorprifoz, 30 ml mısır yağında 4,8 g malathion ve 30 ml mısır yağında 2,4 g tebukonazol çözündürülerek hazırlanmıştır.

Rastgele seçilen laboratuvar hayvanları, her bir grupta yedi sıçan olacak şekilde dokuz gruba ayrılmıştır. Gruplar;

Kontrol Grubu: %0,9'luk serum fizyolojik, **Mısır Yağı Grubu:** 50 mg kg⁻¹ mısır yağı, **Lupeol Grubu:** 20 mg kg⁻¹ lupeol, **Malathion Grubu:** 50 mg kg⁻¹ malathion, **Klorprifoz Grubu:** 10 mg kg⁻¹ klorprifoz, **Tebukonazol Grubu:** ilk 4 gün 50 mg kg⁻¹, son 4 gün 25 mg kg⁻¹ tebukonazol, **Malathion + Lupeol Grubu:** 50 mg kg⁻¹ malathion + 20 mg kg⁻¹ lupeol, **Klorprifoz + Lupeol Grubu:** 10 mg kg⁻¹ klorprifoz + 20 mg kg⁻¹ lupeol, **Tebukonazol + Lupeol Grubu:** İlk 4 gün 50 mg kg⁻¹ tebukonazol + 20 mg kg⁻¹ lupeol, son 4 gün 25 mg kg⁻¹

tebukonazol + 20 mg kg⁻¹ lupeol olarak düzenlenmiştir. Tüm uygulamalar 10 günde 8 kere olacak şekilde gavaj yolu ile yapılmıştır.

3.1.2. Diseksiyon

Deney periyodunun sonunda, diseksiyondan bir gece önce, hayvanların oral beslenmesi kesilerek sadece su içmelerine izin verilmiştir. Anestezi 50 mg kg⁻¹ ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve 10 mg kg⁻¹ Xylazine HCl (Alfazyne®, Hollanda) kas içine enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Diseksiyondan önce ağırlıkları tartılan sıçanların kalplerinin atriumundan, biyokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere, serum eldesi sağlanması amacıyla, kan örnekleri alınmıştır. Disekte edilen hayvanların karaciğer dokusu histolojik incelemeler için Bouin fikstatifine, immünohistokimyasal incelemeler için nötral formalin fikstatifine alınmıştır. Biyokimyasal incelemeler için alınan dokular %0,9'luk serum fizyolojik içinde, ELİSA metodu uygulanacak dokular fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içinde çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2. HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

Histolojik incelemeler için alınan karaciğer dokuları 20-22 saat boyunca Bouin fikstatifinde bekletilmiştir. Fikse edilen dokular fikstatifin giderilmesi için bir hafta boyunca günde üç defa %70 etil alkolden geçirilmiştir. Bir hafta sonunda rutin takip işlemlerinden geçirilen dokular (%70, %80, %90, %96, %100 yükselen etil alkol serisi) en son aşamada saydamlaştırma işlemi için ksilende bekletilerek parafine gömülmüştür. 4 µm kalınlığında alınan doku kesitlerine, Hematoksilen & Eozin (HE) ve Masson'un üçlü boyası prosedürleri uygulanarak, histolojik hasarın mikroskopta incelenmesi için uygun hale getirilmiştir. Olympus CX 41 model ışık mikroskobu ile incelenen ve Olympus DP71 model kamera ile fotoğrafları çekilen preparatların yarı-kantitatif histopatolojik hasar dereceleri literatür doğrultusunda yapılmıştır.

Histolojik skora:

Karaciğer hasarının yarı kantitatif histolojik değerlendirilmesi Belaid-Nouira ve diğ. (2013)'nin tarafından bildirilen kriterlere göre belirlenmiştir. Karaciğer dokusu histolojik hasar skorası için hazırlanan preparatlar saat yönünde kaydırılarak ve rastgele seçilen 10 alanda, x400 büyütmede ışık mikroskobu altında yapılmıştır. Hepatosit ışınal diziliminde bozulma, piknotik nükleus, eozinofilik sitoplazma, sinüzoidlerde genişleme, vakuolizasyon, mononükleer hücre

infiltrasyonu, nüklear vakuolizasyon, vazokonjesyon, fibrozis, nekroz, hiperemi gibi ışık mikroskobu kriterleri göz önüne alınarak her bir bireye ait karaciğer kesitlerindeki histolojik hasarlar değerlendirilmiştir. Her bir histolojik kriter 0 (hasarsız), 1 (az hasar), 2 (orta hasar) veya 3 (şiddetli hasar) şeklinde derecelendirilmiştir.

3.2.1. İmmünohistokimyasal Yöntemler

İmmünohistokimyasal yöntemler için karaciğer dokuları 22 saat boyunca %10'luk nötral formalinde fikstatifinde tespit edilmiştir. Dokular daha sonra fikstatifin giderilmesi için bir hafta boyunca günde üç defa %70'lik etil alkolden geçirilmiş ve rutin takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömülmüştür. Leica mikrotom cihazında alınan kesitler PCNA (Santa Cruz Biotechnology, SC-56) primer antikoruyla, 'streptavidin-biotin peroksidaz' yöntemi (Javois, 1999) uygulanarak immünohistokimyasal olarak incelenmiştir.

PCNA İmmünohistokimyası

Parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki karaciğer kesitleri Poly-L-lizin kaplı lamlara yapıştırılmıştır. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinden sonra distile suya alınan kesitler, antijen iyileştirmesi amacıyla mikrodalga fırında 700 Watt'ta sitrat tamponu (Ph 6) içerisinde 15 dakika inkübe edilmiştir. 3 kez 5'er dakika PBS (fosfatla tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) ile yıkanan kesitler, membran permeabilizasyonu için distile su ile hazırlanan %0,3'lük Triton X-100 ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesini kaldırmak için kesitler 15 dakika %3'lük H₂O₂ içinde bekletilmiştir. PBS ile yıkamanın ardından UltraVision Polyvalent HRP (Thermo Scientific TP-125-HL) kiti kullanılarak, kitin önerdiği şekilde işlemlere devam edilmiştir. Spesifik olmayan boyanmaların engellenmesi için 10 dakika blok solüsyonunun ardından PBS ve Triton-X ile 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan PCNA primer antikoru (Santa Cruz SC-56) oda ısısında 1 saat uygulanmıştır. Bu aşamada negatif kontrol kesitlere sadece PBS uygulanmıştır. PBS ile tekrar yıkanan kesitlere biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika muamelenin ardından 15 dakika streptavidin peroksidaz enzimi uygulanmıştır. PBS ile yıkamanın ardından kromojen olarak AEC (3-Amino-9-Etilkarbazol) (ThermoScientific Chromogen & Substrate TA-125-HA) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra renk oluşumu mikroskop altında gözlemlenmiştir. Sonrasında 5 dakika distile suda bekletilerek reaksiyon durdurulmuş ve zıt boyama amacıyla kesitlere 1:1 oranında sulandırılan Mayer Hematoksilen solusyonu (Bio Optica, CAT No: 05-06002/L) 20-30 saniye uygulanmıştır.

Tekrar distile suya alındıktan sonra kapatma işlemi su bazlı Vision Mount (Thermo Scientific TA-125-UG) ile yapılmıştır. Kesitler incelenene kadar + 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

PCNA boyanma derecesi değerlendirilirken rastgele seçilen 500 hücrede, PCNA pozitif reaksiyon veren hücreler sayılmıştır. Boyanma gösteren hücrelerin sayısının, toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplanmıştır.

$$\text{PCNA pozitif hücre indeksi (\%)} = \frac{\text{PCNA pozitif kript hücre sayısı}}{\text{Toplam kript hücre sayısı}} \times 100$$

3.3. BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Homojenizat hazırlanırken karaciğer dokusu tartılmıştır. Tartılan doku cam homojenizatörde %0,9’luk serum fizyolojik ile homojenize edilerek % 10’luk (w/v) karaciğer dokusu homojenizatı hazırlanmıştır. Homojenizatlar 10.000 x g’de +4 °C’de 20 dakika santrifüje edilmiştir. Elde edilen karaciğer doku homojenizatları Eppendorf tüplerine konularak -76 °C’de deney gününde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.3.1. Karaciğer Dokusu AChE Seviyelerinin Belirlenmesi

Dokuda Asetilkolinesteraz (AChE) seviyelerinin tespiti Rat AChE Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E0724Ra) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem, antijen antikor özgüllüğünden faydalanılarak, örnekte miktarı bilinmeyen bir enzimin veya proteinin seviyelerinin belirlenmesi esasına dayanır. Konsantrasyonu 160 U/L olan 120 µl standart solüsyona 120 µl standart sulandırma tamponu eklenerek stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Stok standart solüsyonu seri olarak standart sulandırma tamponu ile seyreltilerek 80 U/L, 40 U/L, 20 U/L, 10 U/L ve 5 U/L konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Standartlar hazırlandıktan sonra 1 saat içerisinde kullanılmıştır. Mikropleyitin kuyucukları sıçan AChE antijenine karşı üretilen antikor ile kaplıdır. Standart kuyucuklarına 50 µl standart, örnek kuyucuklarına 40 µl örnek ve 10 µl anti-AChE antikor eklenmiştir. Sonra tüm kuyucuklara 50 µl Streptavidin HRP eklenmiştir ve kuyucukların üstü kapatılarak ve 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara 50 µl substrat solüsyon A ve daha sonra 50 µl substrat solüsyon B eklenmiştir.

Karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma tamponu eklenmiştir. Ortama eklenen substrat, enzim bağlı sekonder antikordaki enzimle reaksiyona girerek ürün meydana getirir ve örnekteki AChE miktarı ile doğru orantılı olarak renk değişimi meydana gelir. Bu reaksiyon, durdurma çözeltisi ile sona erdirilerek, Elisa okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve standart grafik oluşturulmuştur.

3.3.2. Karaciğer Dokusu ve Serumda AChE Aktivitelerinin Belirlenmesi

Elde edilen süpernatantlarda ve serumda AChE aktivitesi Ellman ve diğ. (1961) tarafından belirlenen metoda göre tayin edilmiştir. Ellman yönteminin ana prensibine göre; substrat olarak kullanılan asetiltiyokolinin ortamda bulunan AChE enzimi sayesinde hidrolize uğrayarak tiyokoline indirgenmesi ve tiyokolinin Ellman reaktifi olan DTNB ile (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) reaksiyonundan sarı renkli bileşiğin oluşmasıdır. 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçülür ve sarı rengin şiddeti ile AChE aktivitesi doğru orantılıdır.

Kullanılan Çözeltiler

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (0.1 M; pH 8.0): 1,42 g Na_2HPO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlanmıştır. 1,36 g KH_2PO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 8.0 tamponu için 9,5 hacim Na_2HPO_4 ve 0,5 hacim KH_2PO_4 olacak şekilde karıştırılmıştır.

DTNB Çözeltisi (Ellman Reaktifi) (0.01 M): 0,02 g DTNB 5 ml olacak şekilde hazırlanan tampon çözelti ile hazırlanmıştır.

Etopropazin ($8,52 \times 10^{-3}$ M): 0,015 g etopropazin tartılarak, 5 ml distile suda çözölmüştür.

Asetilkolintiyoiyodür (0.015 M): 0,0434 g asetilkolintiyoiyodür tartılarak, 10 ml distile suda çözölmüştür.

Kör tüpü için 2700 µl tampon çözelti üzerine 100 µl DTNB ilave edilmiştir. Numune tüpü için 2550 µl tampon çözelti üzerine 200 µl doku homojenizatı, 100 µl DTNB ve 50 µl etopropazin ilave edilmiştir. Tüpler çalkalanarak, 5 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından numune tüpüne 100 µl asetilkolintiyoiyodür çözeltisi ilave edilmiştir. Örnek ve kör tüplerinin 0. ve 5. dakikalardaki absorbansları 412 nm'de ölçölerek aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.3.3. Karaciğer Dokusu ROT Seviyelerinin Tayini

ROT miktarları Zhang ve diğ. (2018) tarafından belirlenen metoda göre tayin edilmiştir. 5µl süpernatant, 55 µl HEPES (0.02 M) ve 90 µl taze 2', 7'-diklorofluoresein-diasetat (20 µM) karıştırılmıştır. 96 kuyucuklu plakada ve 37 ° C'de 30 dakika inkübe edilerek 485 nm dalga boyunda ekstinksiyon değerleri ve 530 nm dalga boyunda emisyon değerleri ölçülmüştür. Aradaki fark alınarak, çıkan sonuçlar mg protein değerine bölünmüştür.

3.3.4. Karaciğer Dokusu LPO Seviyelerinin Belirlenmesi

Elde edilen süpernatantlarda LPO Ledwozyw ve diğ., (1986) tarafından belirlenen metoda göre tayin edilmiştir. Yöntem, MDA gibi LPO sonucu oluşan ürünlerin reaksiyonu ile meydana gelen pembe renkli bileşiğin 532 nm dalga boyunda okunması esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

Triklorasetik Asid Çözeltisi (1.22 M) (0.6 M HCl'de):49,83 g triklorasetik asit (TCA) 0,6 M HCl'de çözüldü ve 250 ml'ye 0,6 M HCl ile tamamlanmıştır.

NaOH (1 M): 4 g NaOH bir miktar destile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Tiyobarbitürik Asid Çözeltisi (0.047 M):500 mg tiyobarbitürik asit (TBA) 6 ml 1 M NaOH ve 69 ml distile suda çözülmüştür.

Standart Çözeltisi (4.4 nmol/mL 1,1,3,3-tetra etoksi propan): 0,1 ml 1,1,3,3-tetra etoksi propan distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

n-Butanol: Direkt orijinal şişesinden kullanılmıştır.

Numune tüpü için 0,5 ml doku homojenizatı ve üzerine 2,5 ml 1.22 M TCA eklenerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında beklenmiştir. Kör tüpü için 0,5 ml distile su ve 2,5 ml 1.22 M TCA çözeltisi, standart tüpü için 0,5 ml standart çözeltisi ve 2,5 ml 1,22 M TCA çözeltisi alınmıştır. Kör, numune ve standart tüplerinin hepsine 0,75 ml TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler, 30 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Ardından, tüpler soğutulularak, bütün tüplere 2 ml n-butanol ilave edilip vortekslenmiştir. Tüm tüpler, 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Butanol fazı alınarak, numune ve standart tüplerinin absorbansları, kör tüpüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.3.5. Karaciğer Dokusu GSH Seviyelerinin Belirlenmesi

Elde edilen süpernatantlarda, GSH düzeyleri Beutler (1975) tarafından belirlenen metoda göre tayin edilmiştir. Yöntem, sülfidril gruplarının Ellman ayırıcı (5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ile girdiği reaksiyon sonucu oluşturduğu sarı rengin 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürme Çözeltisi: 1,67 g metafosforik asit, 0,2 g EDTA Na₂ ve 30 g NaCl metal iyonları içermeyen distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti +4°C'de 3 hafta dayanıklıdır.

Sodyum Sitrat Çözeltisi (%1): 1 g sodyum sitrat distile suda çözülerek 100 ml 'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti belirtme reaktifi hazırlanırken kullanılmıştır.

Belirtme Reaktifi (Ellman Ayırıcı) (%40 mg DTNB): 40 mg 5'-5'-ditiyo-bis-2-nitro benzoik asid (DTNB) %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek 100 ml'ye bu çözelti ile tamamlanmıştır. Çözelti +4°C'de 13 hafta dayanıklıdır.

Sekonder sodyum Fosfat Çözeltisi (0.3 M): 4,26 g Na₂HPO₄ biraz destile suda çözülmüştür ve 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Glutasyon Standart Çözeltisi: 100 mg glutasyon (GSH) distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden 2, 4, 6, 8, 10 mg GSH/100 ml olacak şekilde glutasyon standartları hazırlanarak, bunlar yardımıyla glutasyon standart eğrisi çizilmiştir.

Deneyin Yapılışı: 0,5 ml doku homojenatına, 0,75 ml çöktürme çözeltisi eklendikten sonra vortekslenerek, 3000 rpm'de 5 dk santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar toplanmıştır. Kör tüpü için 0,5 ml distile su alındı, 2 ml 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Numune tüpü için 0,5 ml süpernatant, 2 ml 0,3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Standart tüpü için ise, 0,5 ml standart çözelti alınarak, 2 ml 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,25 ml belirtme reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Örnekler 412 nm dalga boyunda kör tüpüne karşı okunmuştur.

3.3.6. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesinin Belirlenmesi

Karaciğer dokusundaki katalaz (CAT) aktivitesi, Aebi yöntemine göre tayin edilmiştir. Yöntem, H_2O_2 'nin katalaz enzimi vasıtasıyla H_2O 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbands değerinin azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Aebi, 1984).

Kullanılan Çözeltiler

Serum Fizyolojik (% 0.9 NaCl): 9 g NaCl distile suda çözülerek hacmi 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır.

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM; pH 7.0): 0,708 g Na_2HPO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. 0,680 g KH_2PO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 7.0 tamponu için 9 hacim Na_2HPO_4 ve 1 hacim KH_2PO_4 olacak şekilde karıştırılmıştır.

H_2O_2 (30 mM): Yoğunluğu 1.13 g/ml olan %35'lik H_2O_2 'den 258 μ l alınarak, 50 mM pH 7.0 olan sodyum-potasyum fosfat tamponuyla hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Kör tüpü, 0,5 ml %0,9 NaCl üzerine 2 ml 30 mM H_2O_2 çözeltisi eklenmesi ile hazırlanmıştır. Numune tüpü ise 0,5 ml doku süpernatantına 30 mM H_2O_2 çözeltisi ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Tüplerin absorbandsı 0. ve 1. dakikalarda 240 nm'de okunmuştur.

3.3.7. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesinin Tayini

Elde edilen süpernatantlarda, SOD aktiviteleri Mylroie ve diğ. (1986) tarafından belirlenen metoda göre tayin edilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (50 mM) (pH 7.8): 0,708 g Na_2HPO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlanmıştır. 0,680 g KH_2PO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 7.8 tamponu için 9 hacim Na_2HPO_4 ve 1 hacim KH_2PO_4 olacak şekilde karıştırılmıştır.

Etilendiamintetraasetik Asid (EDTA) (0.1 mM): 0,0037 g EDTA tartılarak, hazırlanan 50 mM pH 7.8 sodyum-potasyum fosfat tamponu içinde çözülmüştür.

Sodyum-Potasyum Fosfat Tamponu (10 mM) (pH 7.8): 0,142 g Na_2HPO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. 0,136 g KH_2PO_4 bir miktar distile suda çözülerek, son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH 7.8 tamponu için 9 hacim Na_2HPO_4 ve 1 hacim KH_2PO_4 olacak şekilde karıştırılmıştır.

Riboflavin Çözeltisi (0.2 mM): 7,3 mg riboflavin tartılarak, hazırlanan 10 mM pH 7.8 sodyum-potasyum fosfat tamponunda çözülmüştür.

o-Dianisidin Hidroklorür Çözeltisi: 19 mg o-dianisidin, 10 ml distile suda çözülmüştür.

SOD (120 IU /ml) Stok Standardı: Liyofilize SOD standardı 120 IU /ml olacak şekilde soğuk distile su ile çözülerek ve bu stok standarttan uygun hacimler alınarak deney ortamında 2, 4, 6, 8, 10 ünite SOD olması sağlanır. Standartlar değerleri okunarak, absorbans ve konsantrasyon arasında grafik çizilmiştir. Kör tüpü için 2,7 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0,1 ml o-dianisidin ve 0,2 mL riboflavin çözeltisi ilave edilmiştir. Numune tüpü için 2,6 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0,1 mL doku homojenizatu, 0,1 ml o-dianisidin ve 0,2 ml riboflavin çözeltisi ilave edilmiştir. Standart tüpü için 2.6 ml sodyum-potasyum fosfat çözeltisine, 0.1 ml standart çözeltisi, 0,1 mş o-dianisidin ve 0,2 ml riboflavin çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler vortekste karıştırılarak, 460 nm'de tüplerin ilk absorbans değerleri okunmuştur. Okumadan sonra bütün tüpler floresans ışıkta 8 dakika bekletilerek; ardından 460 nm'de köre karşı ikinci absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafiği yardımıyla yapılan seyreltmelerde göz önüne alınarak doku homojenizatının SOD aktivitesi (U/g protein) cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.8. Serum TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi

Serumda TNF- α seviyelerinin tespiti Rat Tumor Necrosis Factor Alpha Sandwich Elisa Kiti (Bioassay Technology Laboratory, E0764Ra) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem, antijen antikor özgüllüğünden faydalanılarak, örnekte miktarı bilinmeyen bir enzimin veya proteinin seviyelerinin belirlenmesi esasına dayanır. Konsantrasyonu 1280 ng/L olan 120 μl standart solüsyona 120 μl standart sulandırma tamponu eklenerek stok standart solüsyonu hazırlanmıştır. Stok standart solüsyonu seri olarak standart sulandırma tamponu ile seyreltilerek 320 ng/L, 160 ng/L, 80 ng/L ve 40 ng/L konsantrasyonlarında standartlar elde edilmiştir. Standartlar hazırlandıktan sonra 1 saat içerisinde kullanılmıştır. Mikropleyitin kuyucukları TNF- α sıçan antijenine karşı üretilen antikor ile kaplıdır. Standart kuyucuklarına 50 μl standart, örnek kuyucuklarına 40 μl örnek eklenmiştir ve 10 μl anti-TNF- α antikor eklenmiştir. Sonra

standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir. Kuyucukların üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir. Kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara 50 µl substrat solüsyon A ve daha sonra 50 µl substrat solüsyon B eklenerek, karanlıkta 10 dakika inkübe edilmiştir. Ortama eklenen substrat, enzim bağlı sekonder antikordaki enzimle reaksiyona girerek ürün meydana getirir ve örnekteki TNF- α miktarı ile doğru orantılı olarak renk değişimi meydana gelir. Reaksiyon, durdurma çözeltisi ile sona erdirilerek ve sarı rengin oluşumu için 10 dakika bekletilmiştir. Absorbans Elisa okuyucuda 450 nm dalga boyunda okunmuştur. Standartlarla elde edilen değerlerle çizilen grafikten yararlanarak TNF- α düzeyi hesaplanmıştır.

3.3.9. Total Protein Tayini

Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak Lowry yöntemine göre yapılmıştır (Lowry ve diğ., 1951). Yöntemin esası, alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulan proteinlerin Folin ayırıcı ile indirgenmesi sonucu oluşan mavi rengin şiddetinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm analizler NCSS paket programı ve Graphpad Prism kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir. Biyokimyasal sonuçların değerlendirilmesinde unpaired t-testi ve ANOVA varyans analizi uygulanırken, total histolojik skor sonuçları One way ANOVA ve post hoc Tukey test, immünohistokimya sonuçlarında ise ikili gruplar arasında Mann Withney U nonparametrik testi uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Tüm grafikler Origin programında çizilmiştir.

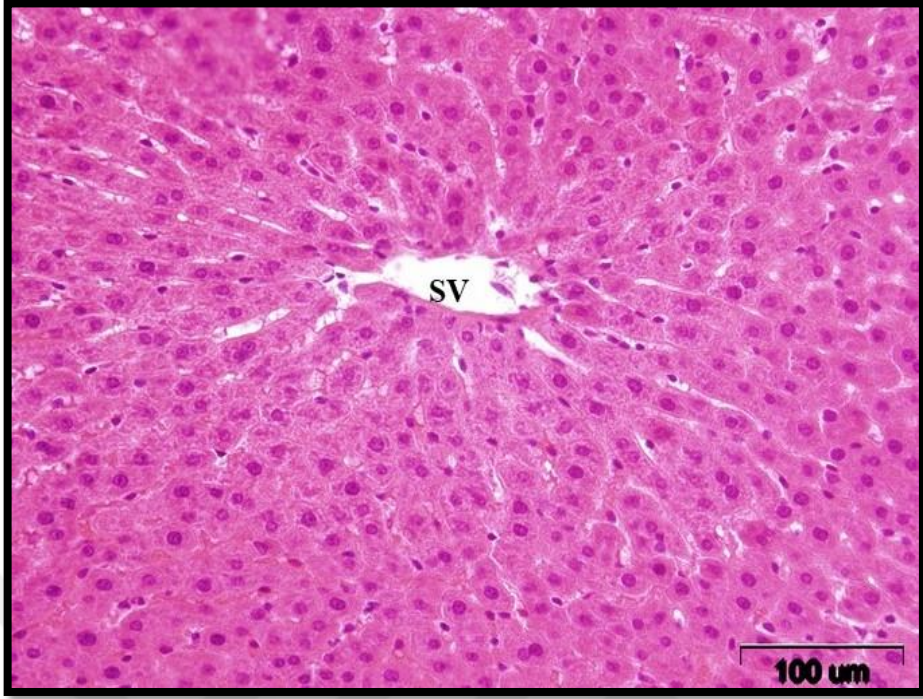
4. BULGULAR

4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR

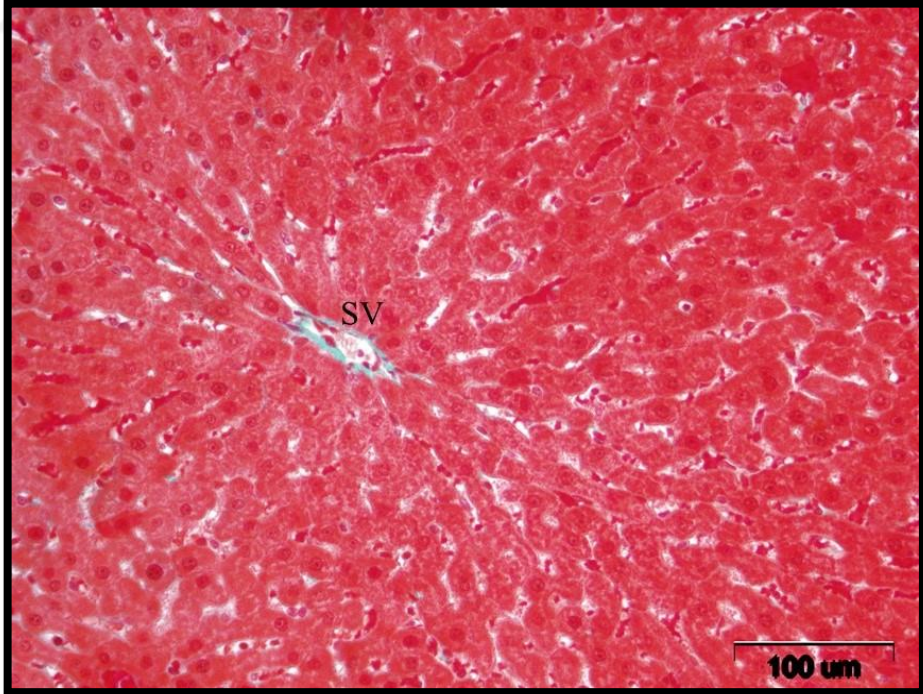
Karaciğer dokusuna ait kontrol ve deney gruplarına ait preparatlar Olympus CX 41 model ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

4.1.1. Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait bireylerde karaciğer dokusunun genel morfolojik görünümün hakim olduğu gözlemlenmiştir. HE ve Masson'un üçlü boyasının uygulandığı kesitlerde hepatositlerin düzgün ışınsal dizilimde olduğu, sentral ven, sinuzoid ve portal alanların normal histolojik görünümüne sahip olduğu görülmüştür.



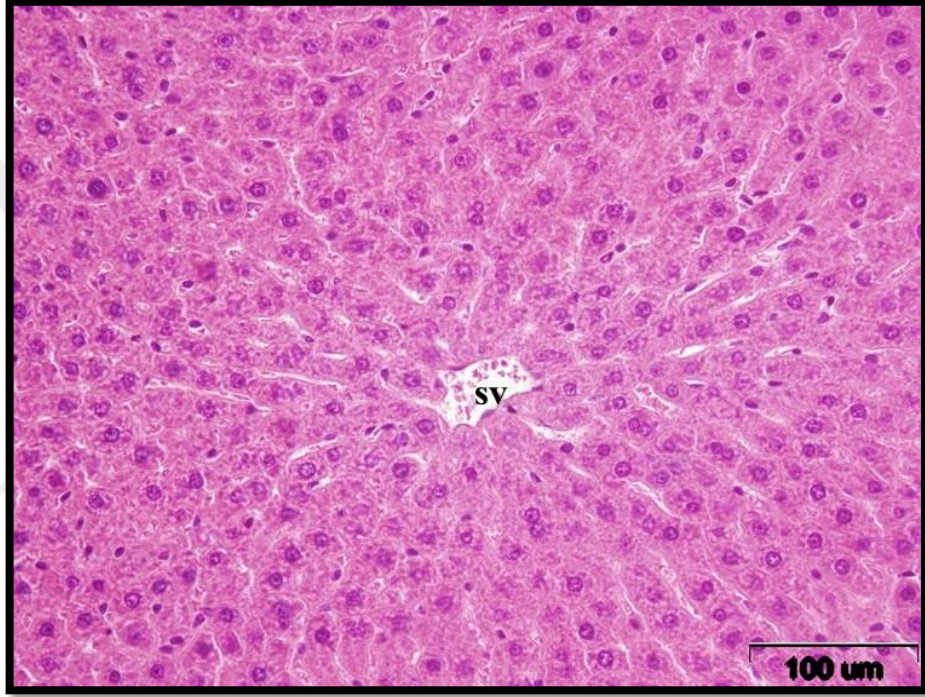
Şekil 4. 1: Kontrol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE boyama, Bar: 100 µm.



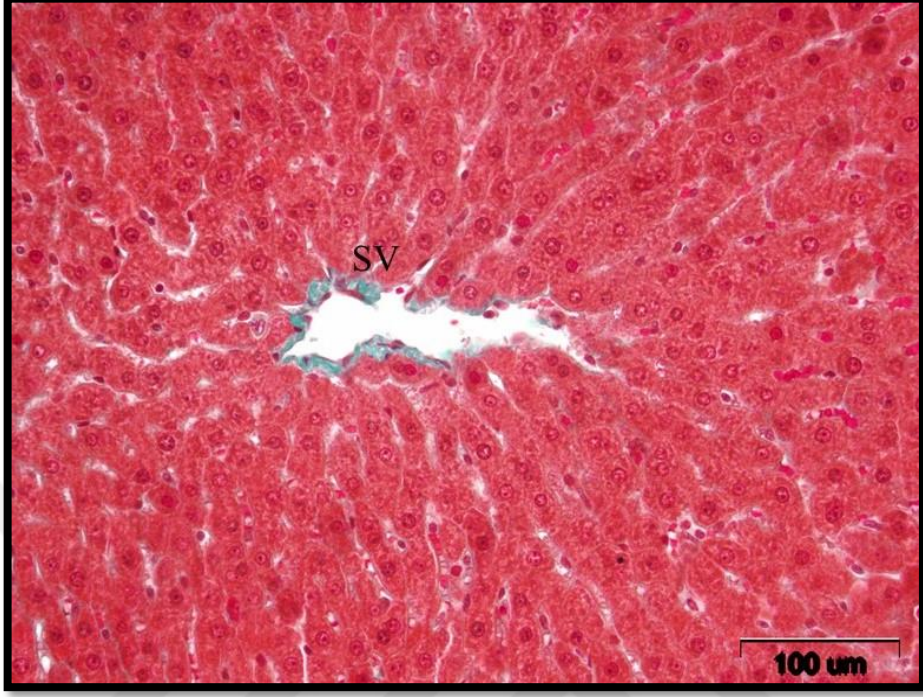
Şekil 4. 2: Kontrol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'nun üçlü boyası, Bar: 100 µm.

4.1.2. Mısır Yağı Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Mısır yağı grubuna ait bireylerde karaciğer dokusuna ait genel morfolojik görünümün hakim olduğu gözlemlenmiştir. HE ve Masson'un üçlü boyasının uygulandığı kesitlerde hepatositlerin ışınsal dizilimde olduğu, sentral venlerin, sinuzoidlerin ve portal alanların normal histolojik görünümüne sahip olduğu görülmüştür.



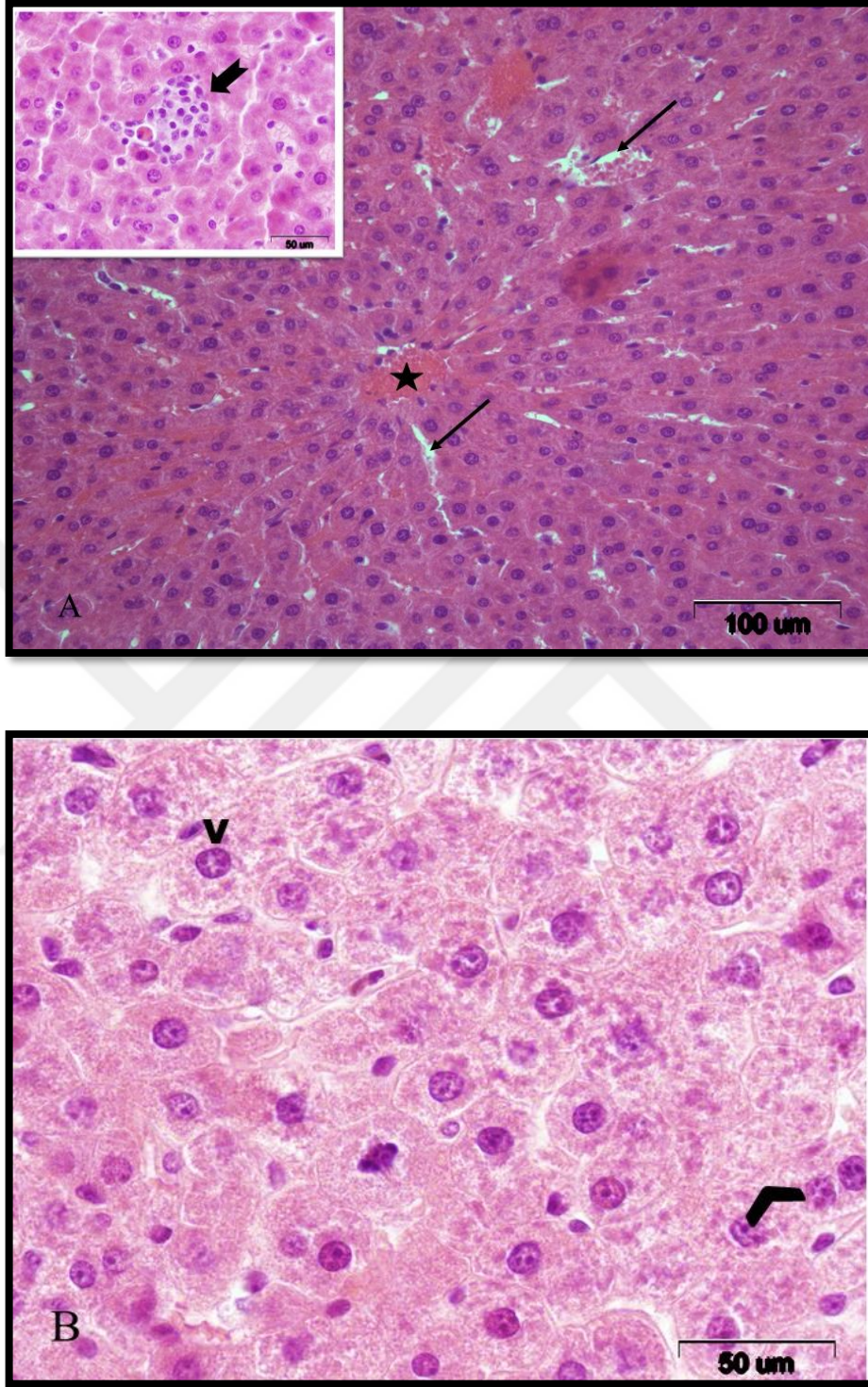
Şekil 4. 3: Mısır yağı grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE, Bar: 100 μm.



Şekil 4. 4: Mısır yağı grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'nun üçlü boyası, Bar: 100 μ m.

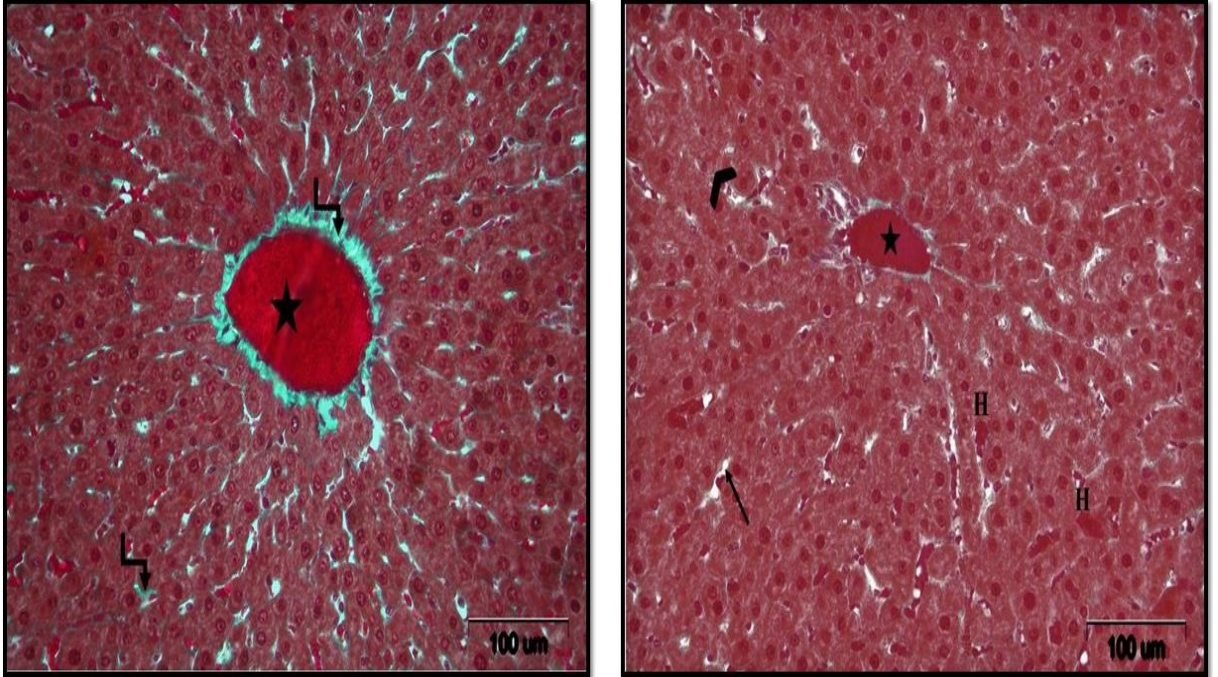
4.1.3. Malathion Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Malathion grubuna ait bireylerin HE ile boyanan kesitlerinde hepatositlerin ışınal diziliminde bozulma, sinüzoidlerde genişleme, piknotik nukleus, mononükleer hücre infiltrasyonu, vakuolizasyon olduğu gözlenmiştir. Masson'un üçlü boyasına ait kesitlerde vasküler konjesyon, hiperemi ve hafif derecede nekroz ile fibrozis gözlenmiştir.



Şekil 4. 5: Malathion grubu. (A) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), Vasküler konjesyon (★), HE, Bar:100 µm

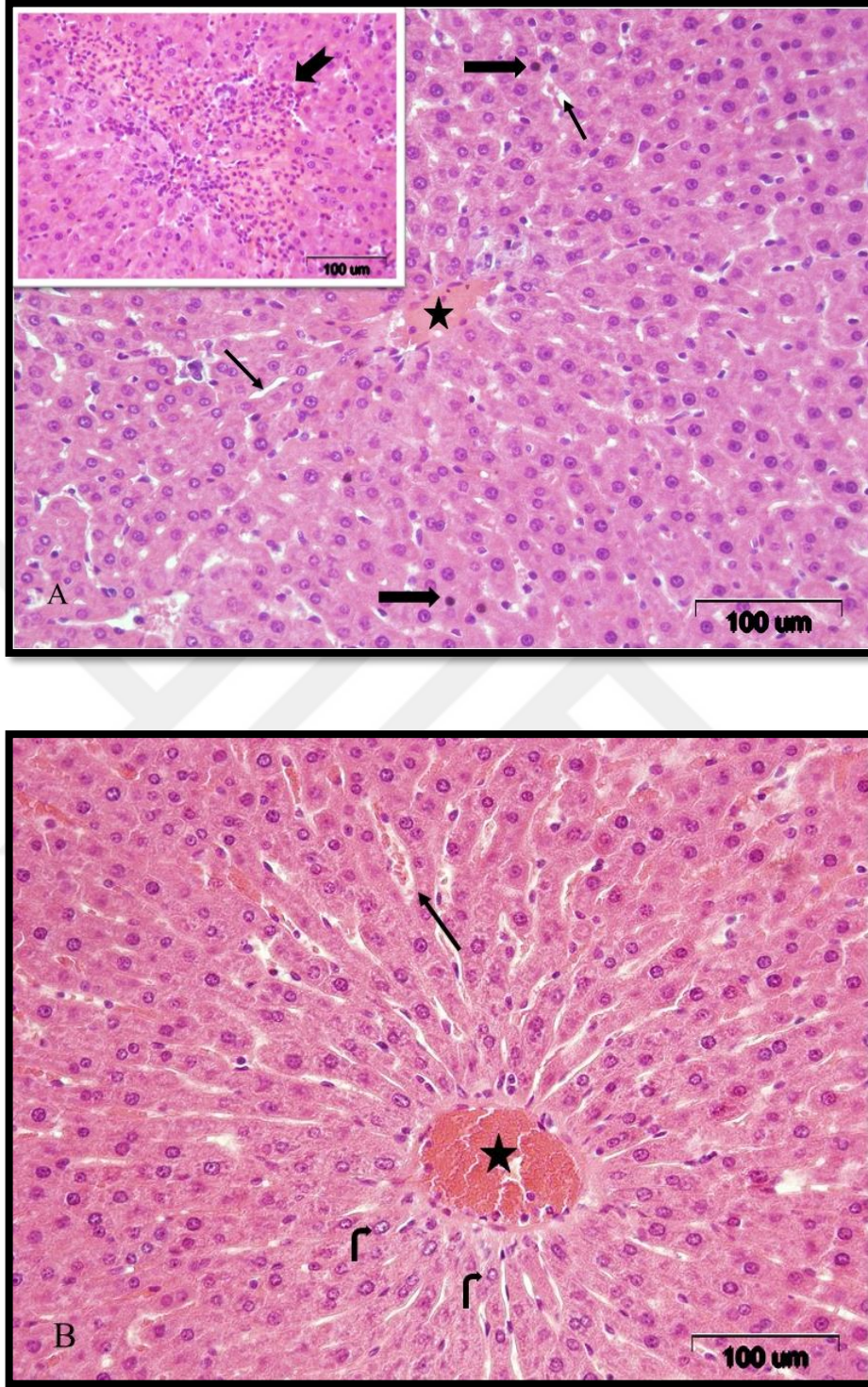
(B) Vakuolizasyon (V), Nekrotik alan (↵), HE, Bar: 50 µm.



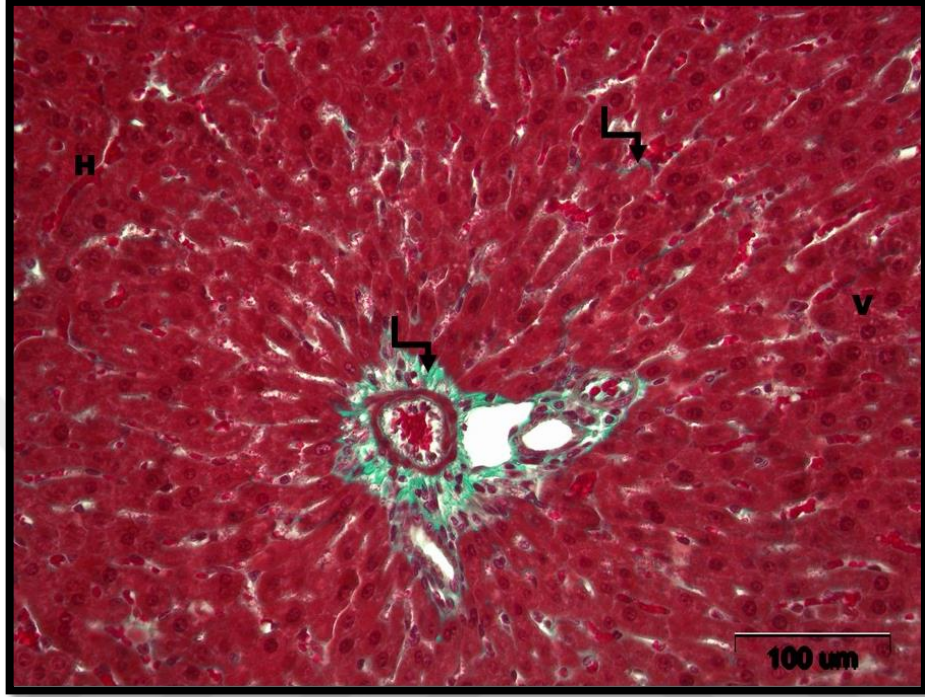
Şekil 4. 6: Malathion grubu. Hepatosit ışımsal diziliminde bozulma, hiperemi (H), sinüzoidal genişleme (→), Vasküler konjesyon (★), Nekrotik alan (↘), fibrozis (dirsek ok), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.

4.1.4. Klorprifoz Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Klorprifoz grubuna ait bireylerin HE ile boyanan kesitlerinde hepatositlerin ışımsal diziliminde belirgin bozulma, sinüzoidlerde genişleme, mononükleer hücre infiltrasyonu ve piknotik nükleus sayısında ciddi artış gözlenmiştir. Ayrıca çoğu hepatositin nükleusu içinde vakuolizasyon olduğu dikkat çekmiştir. Masson'un üçlü boyasına ait kesitlerde çoğu sentral ven de vasküler konjesyon, nekroz, birçok alanda hiperemiye ve hafif derece özellikle portal alan çevresinde fibrozise rastlanmıştır.



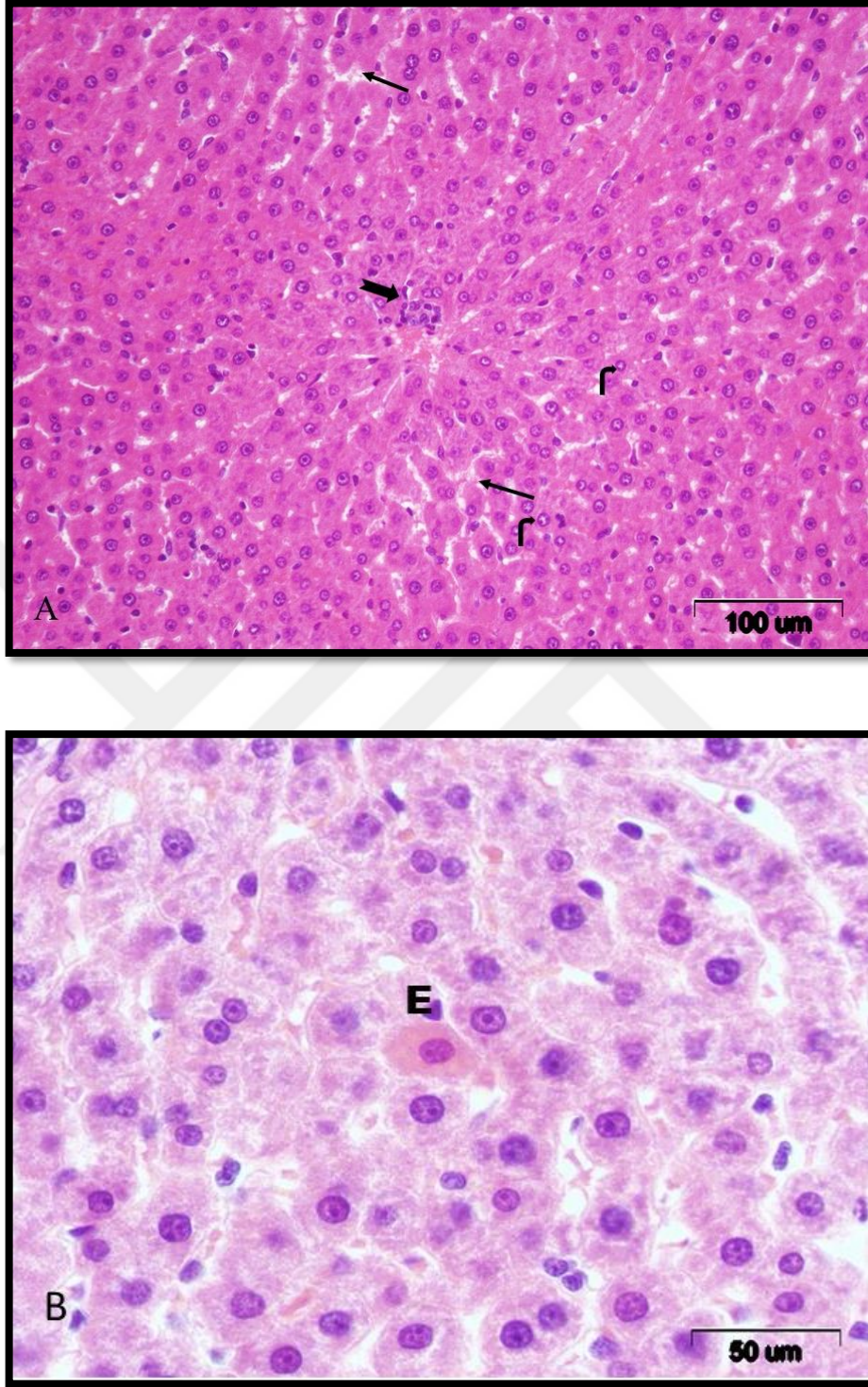
Şekil 4. 7: Klorprifoz grubu. (A, B) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), Vasküler konjesyon (★), piknotik nukleus (kalın ok), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), nükleer vakuolizasyon (dirsek ok), HE, Bar: 100 µm.



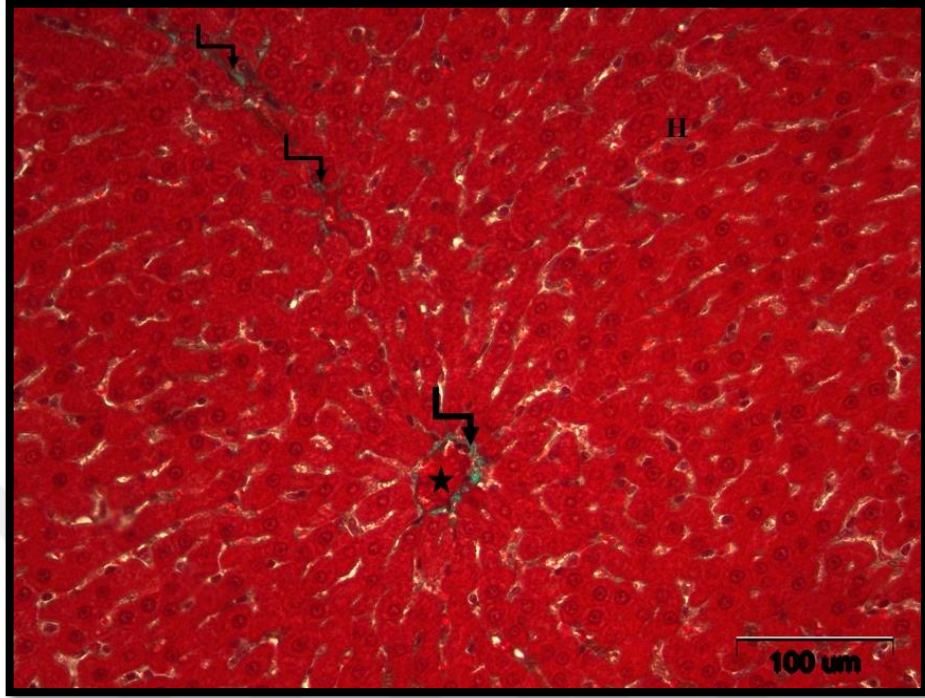
Şekil 4. 8: Klorprifoz grubu. Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, Vakuolizasyon (V), fibrozis (dirsek ok), hiperemi (H), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μ m.

4.1.5. Tebukonazol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Tebukonazol grubuna ait bireylerin HE ile boyanan kesitlerinde hepatositlerin ışınsal diziliminde belirgin bozulma, sinüzoidlerde genişleme, eozinofilik hücre sayısında ve mononükleer hücre infiltrasyonunda artış ile nukleus içerisinde vakuolizasyon görülmüştür. Masson'un üçlü boyasına ait kesitlerde vasküler konjesyon, nekroz ve birçok alanda hiperemiye rastlanmıştır.



Şekil 4. 9: Tebukonazol grubu. (A, B) Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, sinüzoidal genişleme (→), mononükleer hücre infiltrasyonu (➡), eosinofilik hücre (E), nüklear vakuolizasyon (dirsek ok), HE, Bar: 50 µm ve 100 µm.



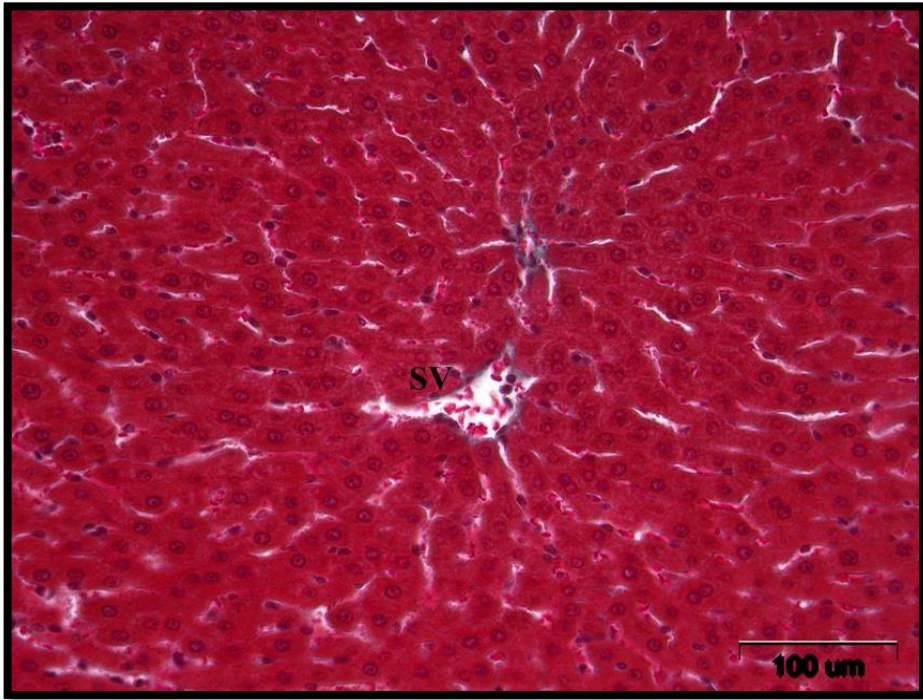
Şekil 4. 10: Tebukonazol grubu. Hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, hiperemi (H), Vasküler konjesyon (★), fibrozis (dirsek ok), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μ m.

4.1.6. Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Lupeol grubuna ait bireylerin HE ile boyanan kesitlerinde hepatositlerin düzgün ışınsal dizilimde olduğu, sentral ven, sinuzoid ve portal alanların normal histolojik görünümüne sahip olduğu görülmüştür. Masson'nun üçlü boyasına ait kesitlerde genel olarak kontrol grubuna yakın görünümde olsa da hafif derece hiperemiye rastlanmıştır.



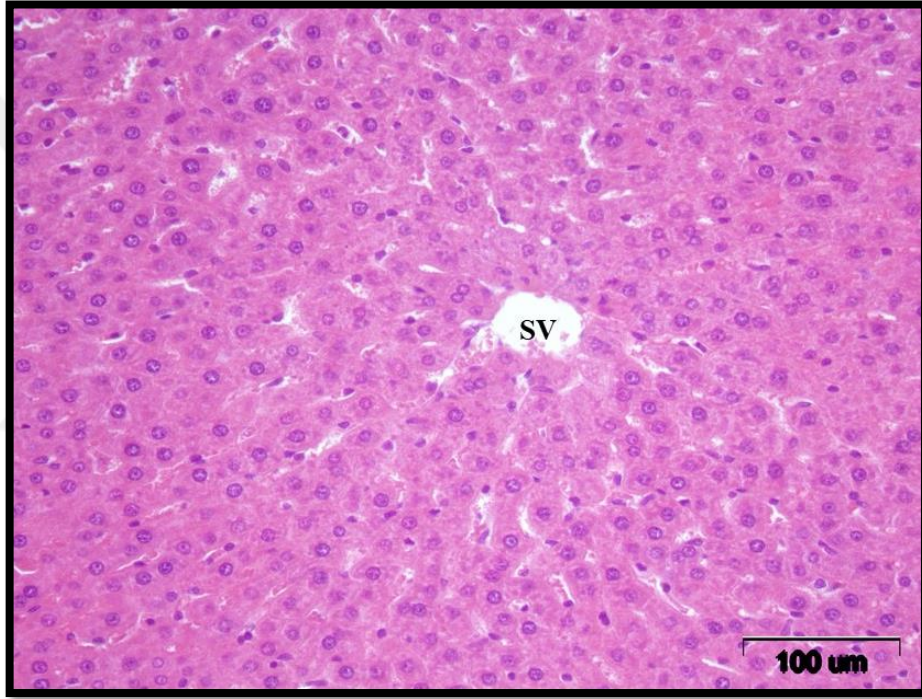
Şekil 4. 11: Lupeol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), HE, Bar: 100 µm.



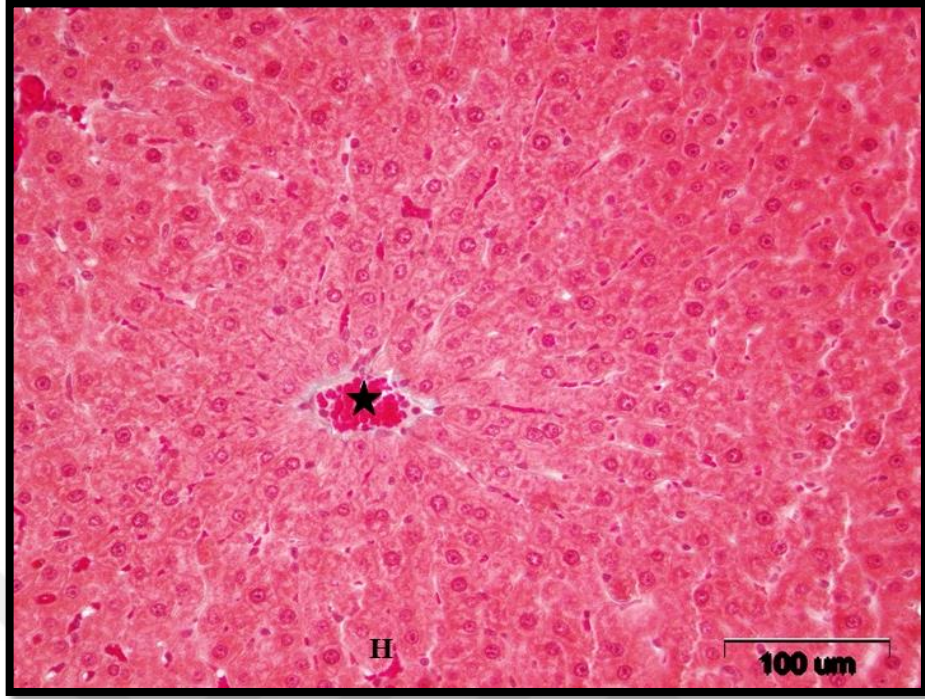
Şekil 4. 12: Lupeol grubu. Karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, santral ven (SV), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 µm.

4.1.7. Malathion + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Malathion + Lupeol grubuna ait bireylerin HE ile boyanan kesitlerinde hepatositlerin düzgün ışınsal görünümüne daha yakın olduğu, malation grubuna göre sinüzoidlerde genişlemenin, nüklear vakuolizasyonun azaldığı görülmüştür. Masson'nun üçlü boyasına ait kesitlerde hafif derece vazokonjesyon, hiperemi ve nekroza rastlanmaktadır.



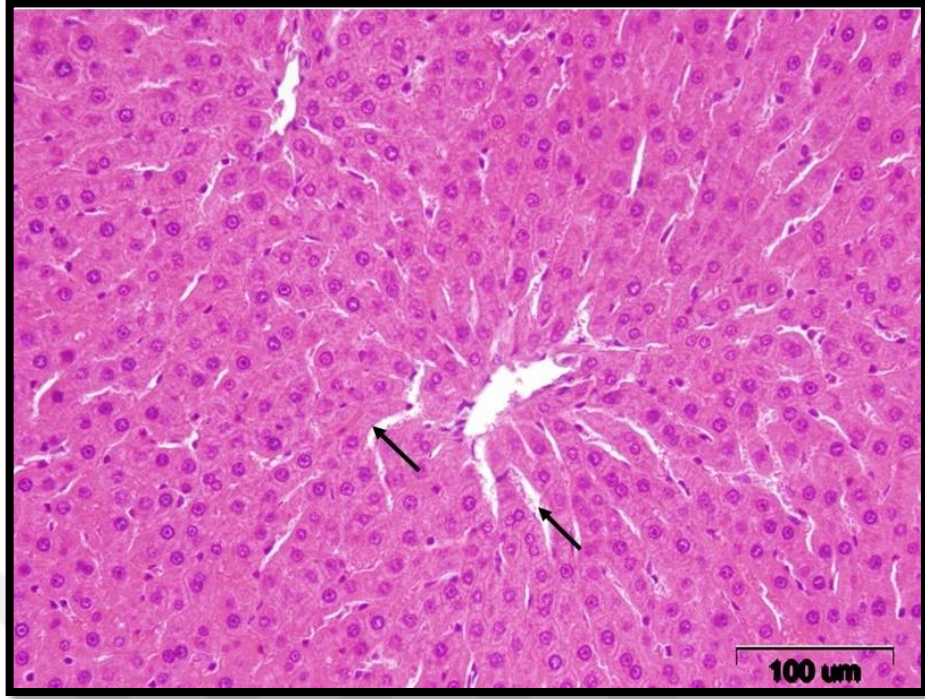
Şekil 4. 13: Malathion + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sentral ven (SV), HE, Bar: 100 µm.



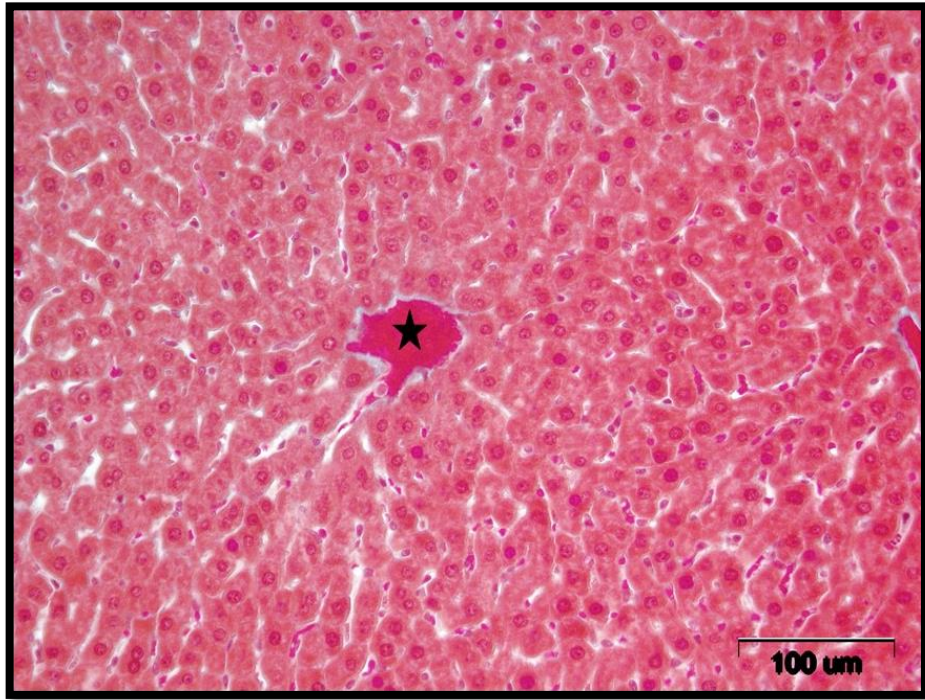
Şekil 4. 14: Malathion + Lupeol grubu. hiperemi (H), Vasküler konjesyon (★), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.

4.1.8. Klorprifoz + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Klorprifoz + Lupeol Grubuna bireylerin HE ile boyanan kesitlerde hepatositlerin düzgün ışınal görünümüne daha yakın olduğu, klorprifoz grubuna göre sinüzoidlerde genişlemenin, nükleer vakuolizasyonun, piknotik nükleusun ve mononükleer hücre infiltrasyonunun azaldığı görülmüştür. Masson'nun üçlü boyasına ait kesitlerde hafif derece hiperemi ve vasküler vazokonjesyon olmakla birlikte nekroz ve fibrozis görülmemiştir.



Şekil 4. 15: Klorprifoz+ Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sinüzoidal genişleme (→), HE, Bar: 100 μm.



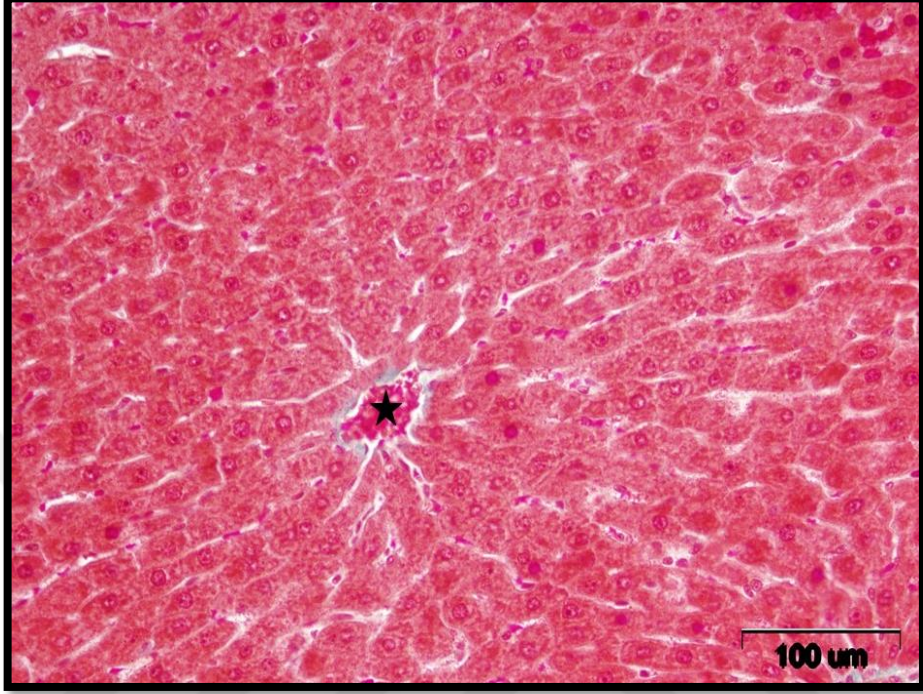
Şekil 4. 16: Klorprifoz + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, Vasküler konjesyon (★), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100μm.

4.1.9. Tebukonazol + Lupeol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Tebukonazol + Lupeol Grubuna bireylerin HE ile boyanan kesitlerde hepatositlerin düzgün ışınsal görünümüne daha yakın olduğu, tebukonazol grubuna göre sinüzoidlerde genişlemenin, nükleer vakuolizasyonun, piknotik nükleusun ve mononükleer hücre infiltrasyonunun azaldığı görülmüştür. Masson'nun üçlü boyasına ait kesitlerde hafif derecede hiperemi ve vasküler vazokonjesyon olmakla birlikte nekroz ve fibrozis gözlenmemiştir.



Şekil 4. 17: Tebukonazol + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, sinüzoidal genişleme (→), HE, Bar: 100 µm.



Şekil 4. 18: Tebukonazol + Lupeol grubu. Düzgün hepatosit ışınsal dizilimi, Vasküler konjesyon (★), Masson'un üçlü boyası, Bar: 100 μm.

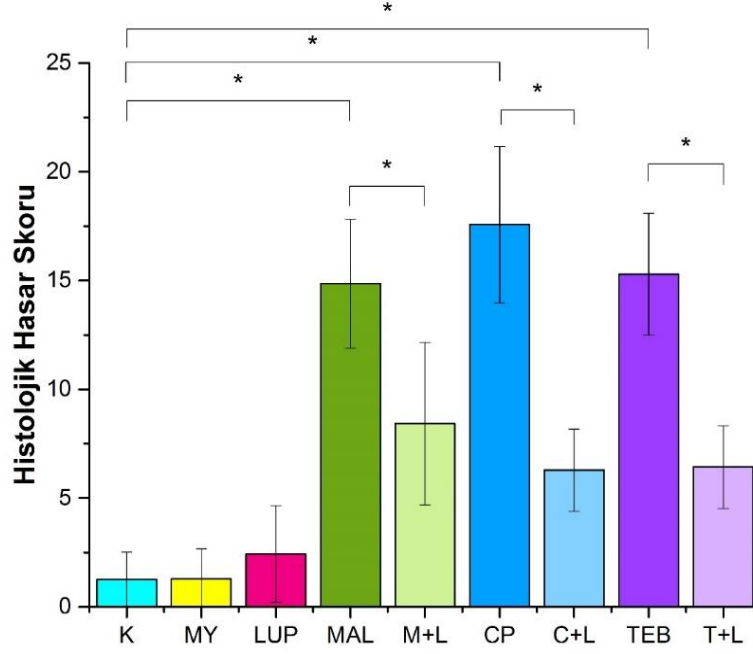
4.1.10. Karaciğer Histolojik Hasar Skoru

Tablo 4. 1: Karaciğer dokusunun yarı kantitatif olarak değerlendirilmesi.

Histolojik Kriter	K n=4	MY n=7	MAL n=7	CP n=7	TEB n=7	LUP n=7	M+L n=7	C+L n=7	T+L n=7
Eozinofilik Hücre	0	0	3	2	8	0	0	1	0
Hepatosit Diziliminde Bozulma	1	1	12	12	12	1	8	7	2
Sinüzoidlerde genişleme	1	1	16	19	14	2	11	11	5
Vakuolizasyon	0	1	12	5	10	1	6	8	3
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	0	1	9	10	14	1	9	5	6
Vazokonjesyon	1	0	15	19	13	3	6	2	11
Piknotik nükleus	0	0	1	9	3	0	0	0	2
Fibrozis	0	0	1	6	4	0	0	1	1
Nekroz	0	0	9	16	7	2	8	3	3
Hiperemi	2	5	15	14	13	7	7	4	9
Nükleer Vakuolizasyon	0	0	11	11	9	0	4	2	3
Ortalama	1,25	1,28	14,85	17,57	15,28	2,42	8,42	6,28	6,42

*Kontrol (K), Mısır yağı (MY), Malathion (MAL), Klorprifoz (CP), Tebukonazol (TEB), Lupeol (LUP), Malathion+Lupeol (M+L), Klorprifoz+Lupeol (C+L), Tebukonazol+Lupeol (T+L).

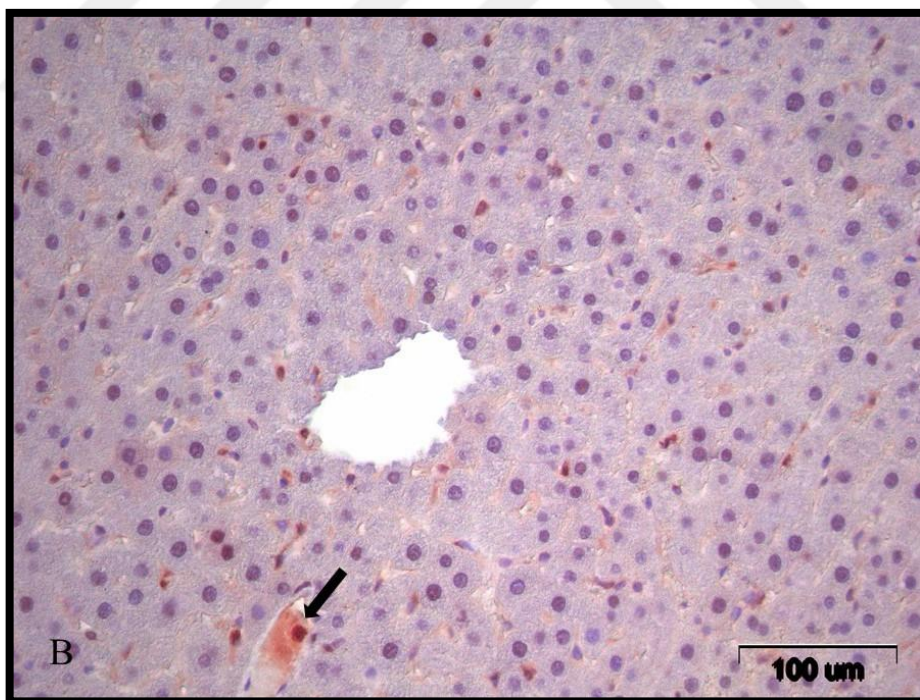
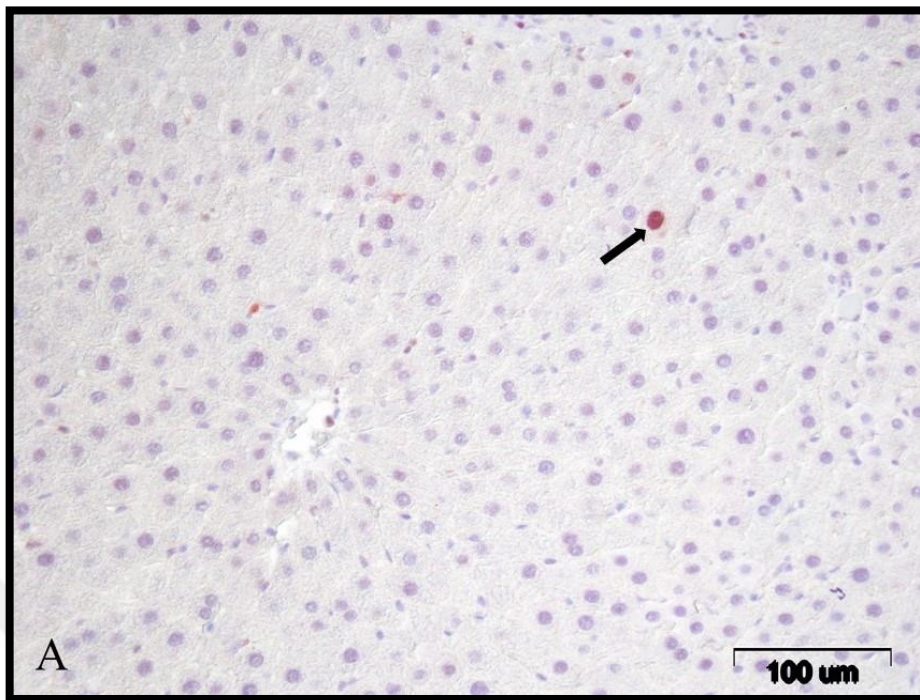
Histolojik incelemeler neticesinde elde edilen sonuçlara göre; pestisit verilen grupların hepsinde kontrole kıyasla histolojik hasarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0,05$). Histolojik hasar mısır yağı grubuna göre de pestisit gruplarında anlamlı bir artış sergilemektedir ($p<0,05$). Pestisit gruplarına antioksidan uygulanması sonucu malathion ve malathion + lupeol grubu arasında; klorprifoz ve klorprifoz + lupeol grubu arasında; tebukonazol ve tebukonazol + lupeol grubu arasında istatistiksel olarak histolojik hasarda anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. ($p<0,05$).

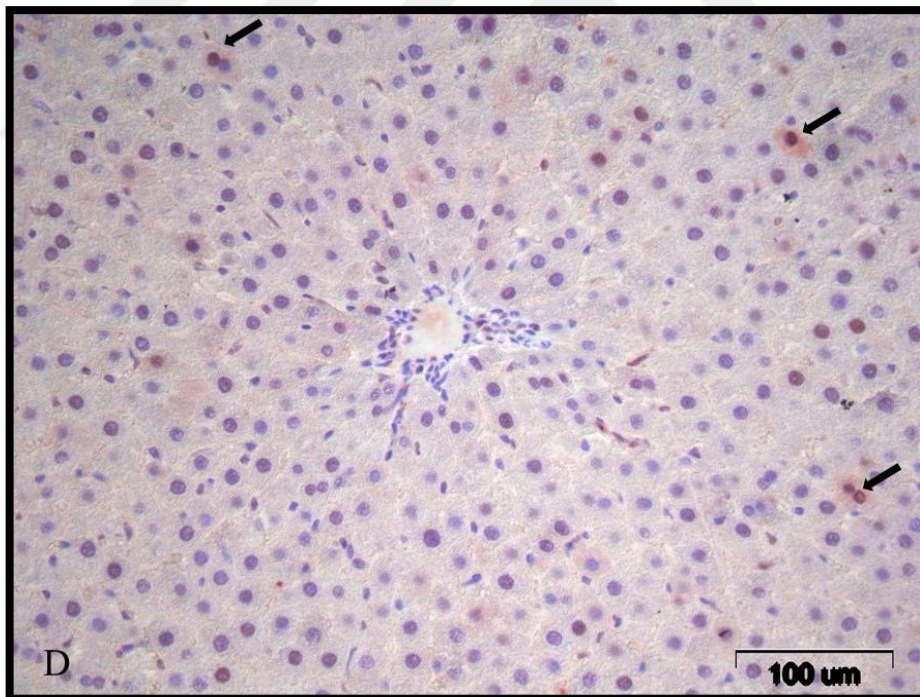
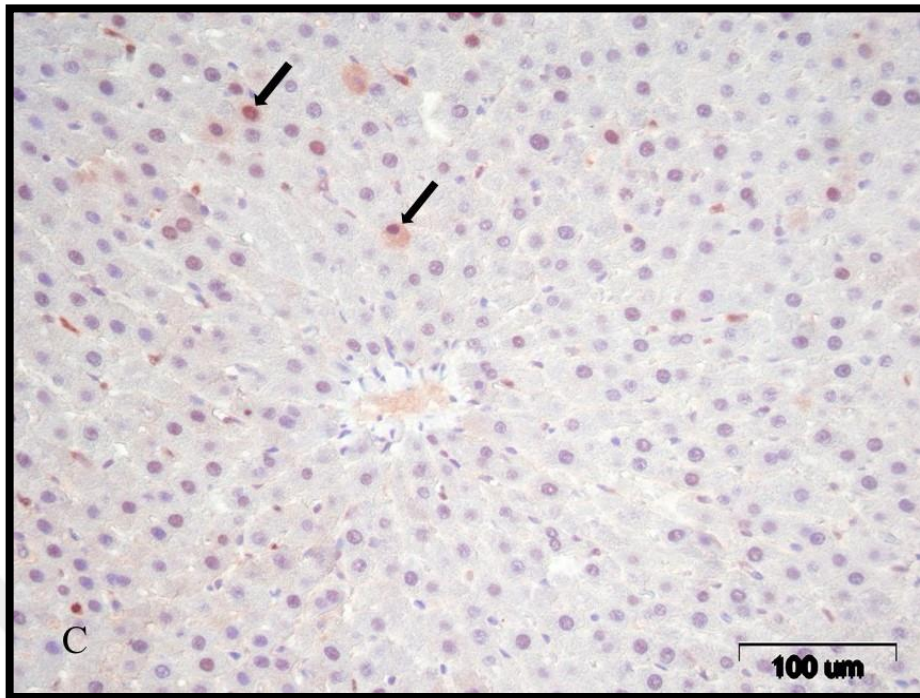


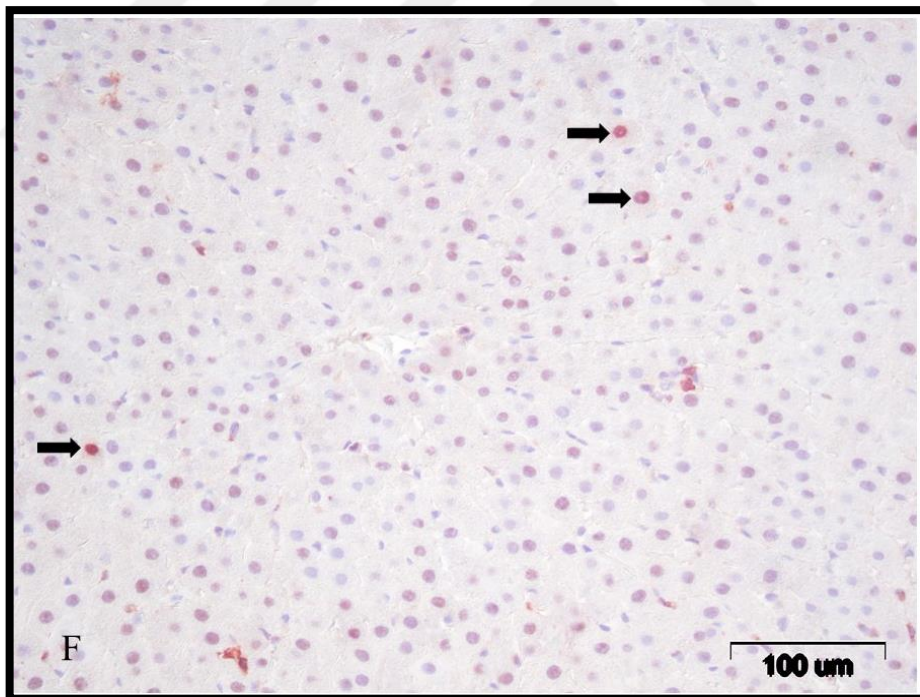
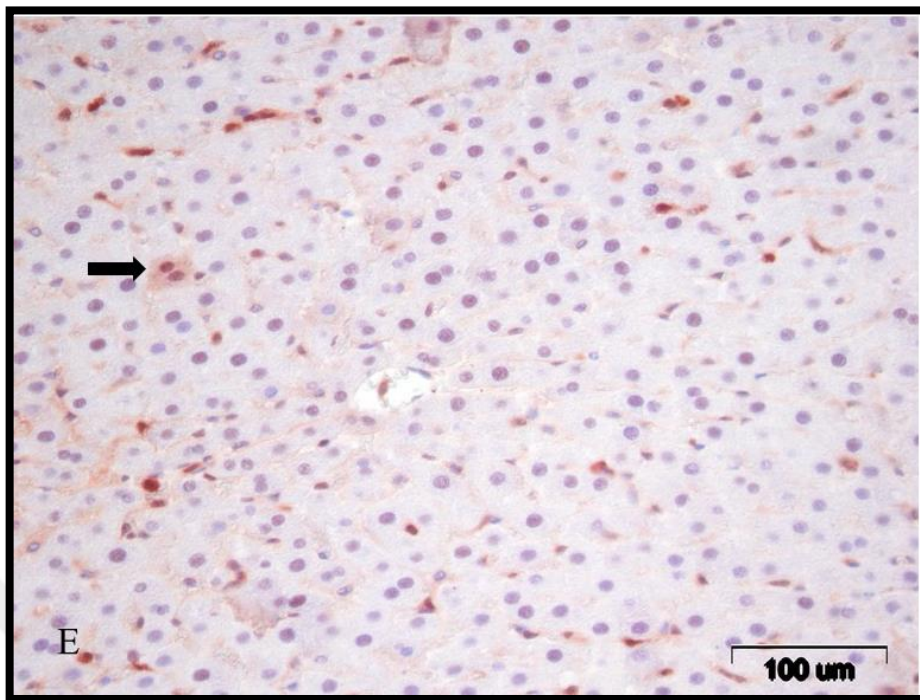
Şekil 4. 19: Histolojik Hasar Skoru, (ortalama ± Standart sapma), *:p<0,05.

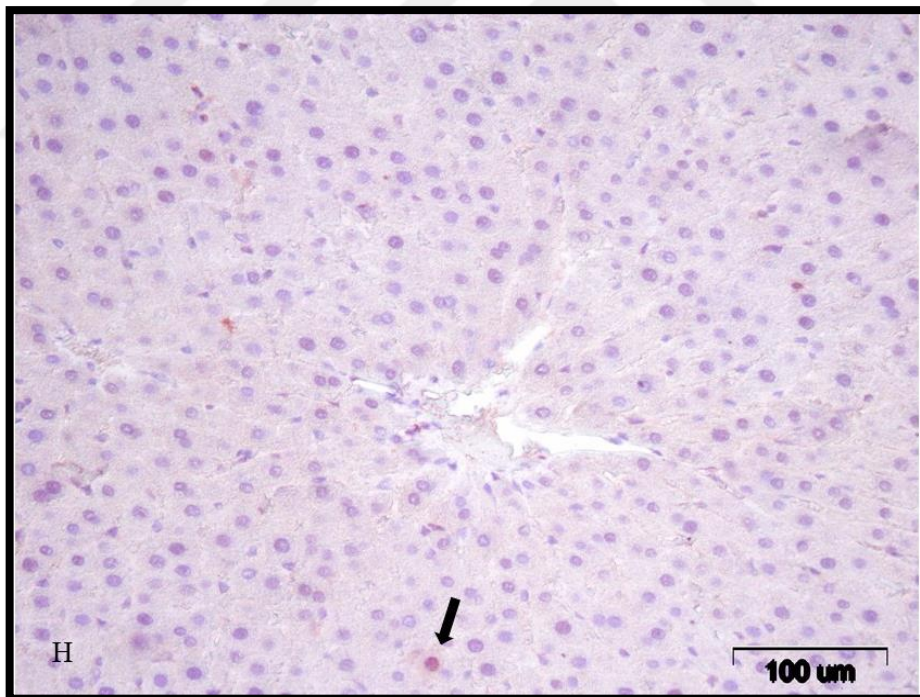
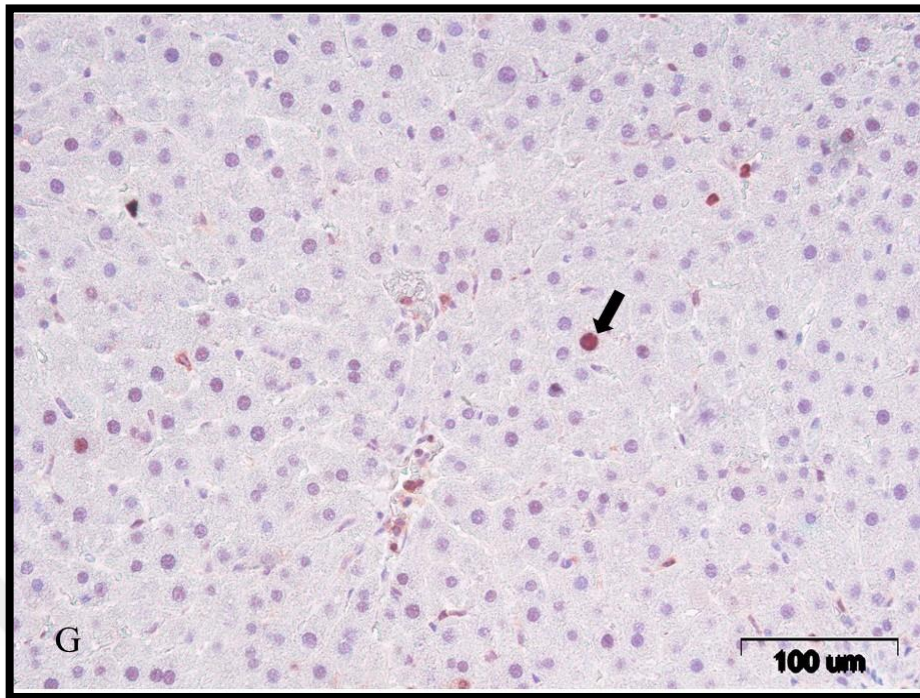
4.2. PCNA İMMÜNOHİSTOKİMYASINA AİT BULGULAR

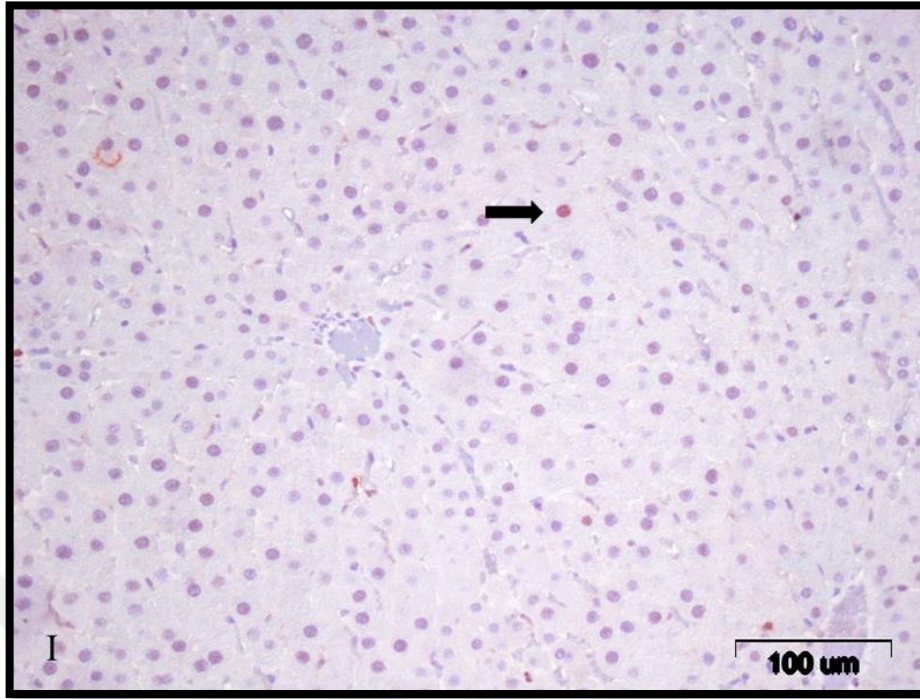
İmmünohistokimyasal incelemeler sonucunda elde edilmiş olan karaciğer PCNA pozitif hücrelerin gruplara göre dağılımı, tablo 4.2 ve şekil 4.21’de gösterilmiştir. Deney grupları arasında PCNA immünohistokimyası sonuçları açısından anlamlı bir farkın varlığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre; pestisit verilen grupların hepsinde kontrole kıyasla PCNA (+) hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken (malathion için $p<0,01$; klorprifoz için $p<0,05$; tebukonazol için $p<0,05$); mısır yağı grubuna kıyasla ise sadece malation ($p<0,01$) ve tebukonazol ($p<0,05$) deney gruplarında anlamlı bir artış görülmektedir. Klorprifoz grubu ise mısır yağı grubuna göre artış gösterse bile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Pestisit gruplarına lupeol uygulanması sonucu PCNA (+) hücre sayısında malathion ve malathion + lupeol grubu arasında ($P<0,01$); klorprifoz ve klorprifoz + lupeol grubu arasında ($P<0,05$); tebukonazol ve tebukonazol + lupeol grubu arasında ($P<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmektedir. Antioksidan verilmiş olan pestisit gruplarının kontrol, mısır yağı ve lupeol grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($P<0,01$).







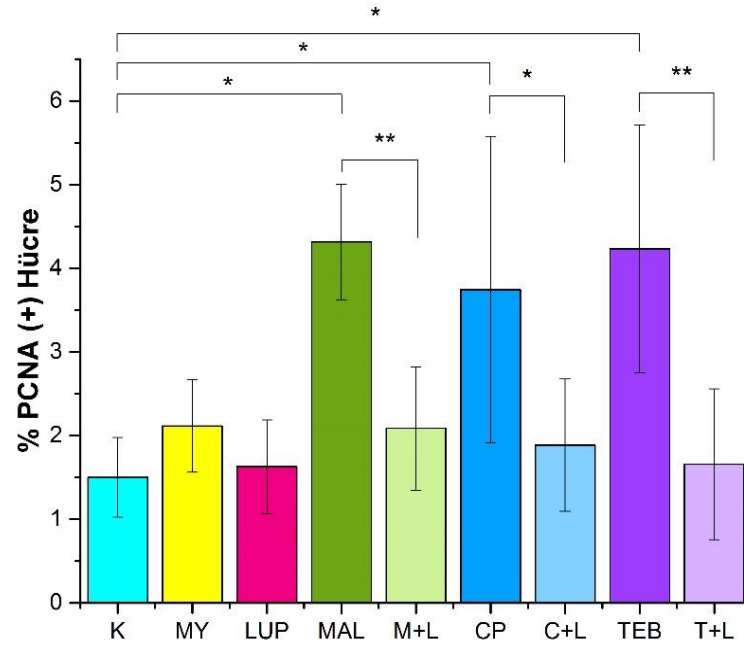




Şekil 4. 20: PCNA pozitif hücrelerin görüldüğü karaciğer kesitleri (A-I). (A) Kontrol grubu, (B) Mısır Yağı grubu, (C) Lupeol grubu, (D) Malathion grubu, (E) Klorprifoz grubu, (F) Tebukonazol grubu, (G) Malation + Lupeol grubu, (H) Klorprifoz + Lupeol grubu, (I) Tebukonazol + Lupeol grubu, PCNA pozitif hücreler (→), Bar: 100 µm.

Tablo 4. 2: % PCNA Pozitif Hücre Sayısı (Ortalama ± Standart sapma).

Deney Grubu	Ortalama ± Standart sapma
Kontrol	1,5 ± 0,48
MY	2,11 ± 0,55
MAL	4,31 ± 0,69
CP	3,74 ± 1,83
TEB	4,23 ± 1,48
LUP	1,63 ± 0,56
M+L	2,09 ± 0,74
C+L	1,89 ± 0,79
T+L	1,66 ± 0,90

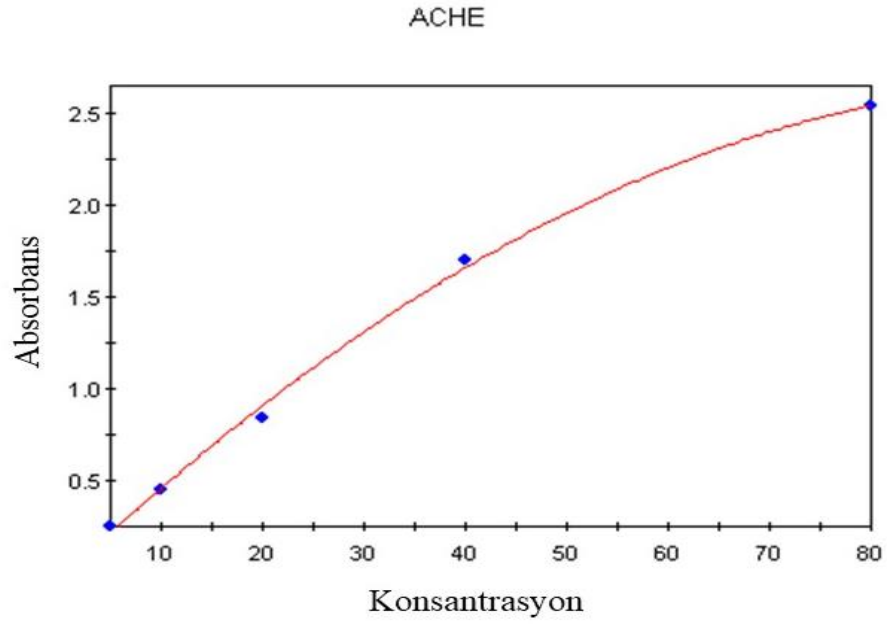


Şekil 4. 21: % PCNA Pozitif Hücre Sayısı *:p<0,05; **: p< 0,005.

4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.3.1. Karaciğer Dokusu AChE Seviyelerine Ait Bulgular

Karaciğer AChE seviyelerine ait tablo 4.3 ve şekil 4.22’de gösterilmiştir. Deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($P > 0,05$).



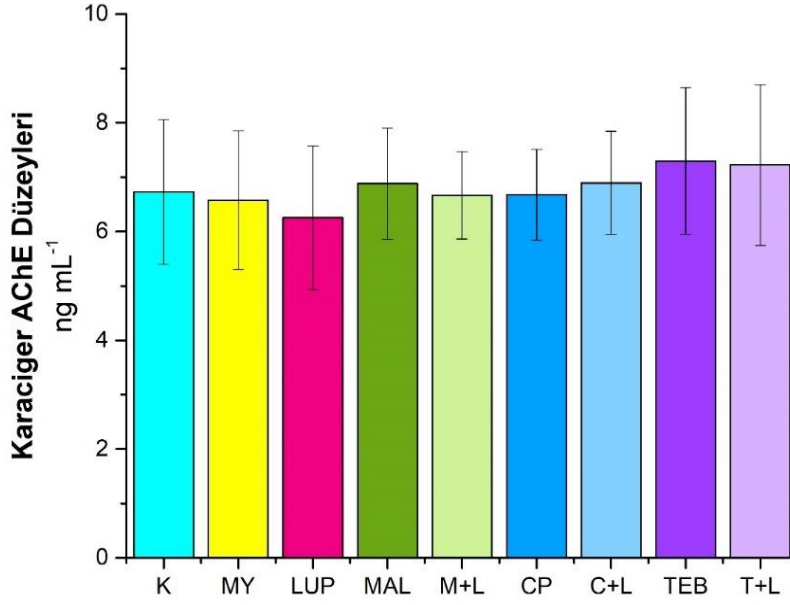
$$y = 0.003 \times^2 + 0.0529 \times + 0.0495$$

$$R^2 = 0,9977$$

Tablo 4. 3: Karaciğer Dokusu AChE Seviyeleri

Deney Grubu	Karaciğer AChE Seviyeleri (ng AChE mg protein ⁻¹),
Kontrol	6,73 ± 1,33
MY	6,58 ± 1,27
MAL	6,88 ± 1,02
CP	6,76 ± 0,83
TEB	7,30 ± 1,35
LUP	6,25 ± 1,32
M+L	6,67 ± 0,80
C+L	6,89 ± 0,95
T+L	7,22 ± 1,48

*(Ortalama ± Standart sapma).



Şekil 4. 22: Karaciğer AChE Seviyeleri (ng mL⁻¹), (ortalama ± Standart sapma). One way ANOVA ve post hoc Tukey test (p:0,05).

4.3.2. Karaciğer Dokusu AChE Aktivitesine Ait Bulgular

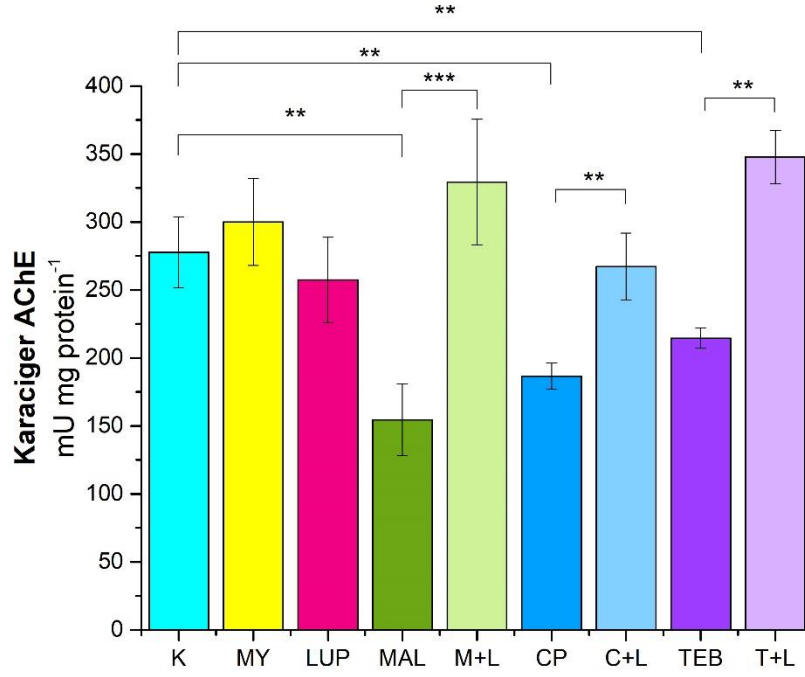
Tüm gruplara ait karaciğer dokusu AChE aktiviteleri tablo 4.4 şekil 4.23’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm gruplar arasındaki anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($P_{ANOVA} = 0,0001$). Kontrol grubuna lupeol uygulanması sonucunda AChE aktivitelerinde anlamsız bir azalma gözlemlenirken, mısır yağı verilen gruba ait AChE aktivitelerinde ise anlamsız bir artış meydana geldiği saptanmıştır. Kontrol grubuna malathion, klorprifoz ve tebukonazol uygulanması ile AChE aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür ($^aP < 0,005$). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol uygulanması ile bu üç gruba ait AChE aktivitelerinde pestisit gruplarına göre anlamlı bir artma olduğu tespit edilmiştir ($^bP < 0,0001$; $^cP < 0,005$; $^dP < 0,005$).

Tablo 4. 4: Karaciğer dokusu AChE Aktivitesi

Deney Grubu	Karaciğer AChE Aktivitesi (mU mg protein ⁻¹),
K	277,53 ± 26,06
MY	299,92 ± 31,88
MAL	154,40 ± 26,50 ^a
CP	186,53 ± 9,71 ^a
TEB	214,52 ± 7,27 ^a
LUP	257,40 ± 31,60
M+L	329,25 ± 46,27 ^b
C+L	267,17 ± 24,67 ^c
T+L	347,80 ± 19,53 ^d
P _{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP <0,005 kontrol grubuna göre; ^bP <0,0001 malathion grubuna göre; ^cP <0,005 klorprifoz grubuna göre; ^dP <0,005 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 23: Karaciğer Dokusu AChE Aktivitesi (mU mg protein⁻¹), (ortalama ± Standart sapma).

: p<0,005; *: p<0,0001.

4.3.3. Serum AChE Aktivitesine Ait Bulgular

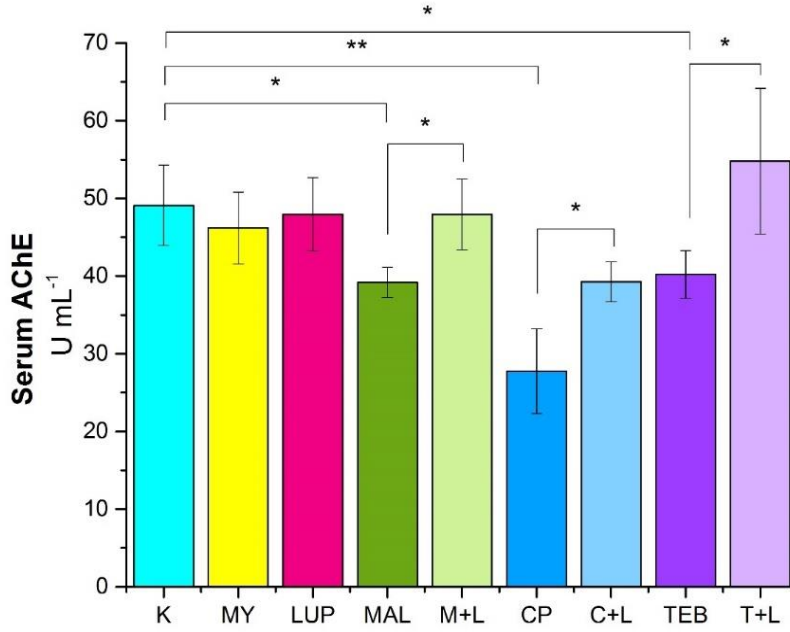
Kontrol ve deney gruplarına ait serum AChE aktiviteleri tablo 4.5 ve şekil 4.24’de gösterilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar olduğu görülmüştür ($P_{ANOVA} = 0,0001$). Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna lupeol ve mısır yağı uygulanması ile AChE aktivitelerinde anlamsız bir azalma olduğu saptanmıştır. Malathion, tebukonazol ve klorprifoz gruplarına ait serum AChE aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir (^aP <0,05; ^bP <0,005). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol uygulanması ile bu değerlerin anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür (^cP <0,05; ^dP <0,05; ^eP <0,05).

Tablo 4. 5: Serum AChE Aktivitesi

Deney Grubu	Serum AChE Aktivitesi (U ml ⁻¹),
K	49,10 ± 5,18
MY	46,18 ± 4,60
MAL	39,17 ± 1,94 ^a
CP	27,76 ± 5,44 ^b
TEB	40,23 ± 3,05 ^a
LUP	47,95 ± 4,72
M+L	47,93 ± 4,56 ^c
C+L	39,28 ± 2,57 ^d
T+L	54,79 ± 9,38 ^e
P _{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP <0,05 kontrol grubuna göre; ^bP <0,005 kontrol grubuna göre; ^cP <0,05 malathion grubuna göre; ^dP <0,05 klorprifoz grubuna göre; ^eP <0,05 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 24: Serum AChE Aktivitesi (U mL⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; **:p<0,005.

4.3.4. Karaciğer Dokusu ROT Seviyelerine Ait Bulgular

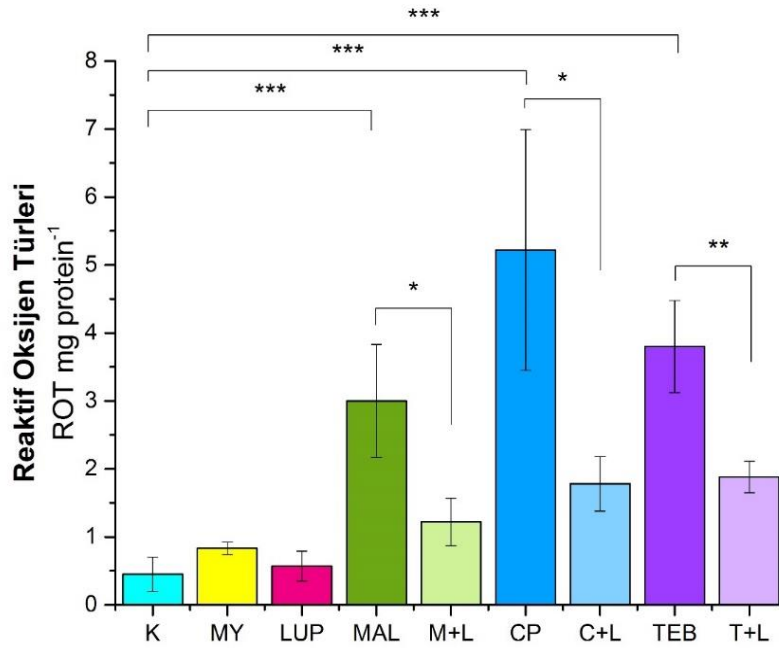
Tüm gruplara ait karaciğer dokusu ROT seviyeleri Tablo 4.6 ve şekil 4.25’de gösterilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki anlamlılık değeri $P_{ANOVA} = 0,0001$ olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna lupeol ve mısır yağı uygulanması ile ROT seviyelerinde anlamsız bir artma meydana geldiği saptanmıştır. Malathion, tebukonazol ve klorprifoz grupları ile kontrol gruplarına ait ROT seviyeleri karşılaştırıldığında, bu değerlerin deney gruplarında anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir (^aP<0,0001). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol uygulanması ile bu değerler anlamlı olarak tersine çevrilmiştir (^bP <0,05; ^cP <0,05; ^dP <0,005).

Tablo 4. 6: Karaciğer Dokusu ROT Seviyeleri

Deney Grubu	ROT Seviyeleri (ROT mg protein ⁻¹)
K	0,45 ± 0,25
MY	0,83 ± 0,09
MAL	3,00 ± 0,83 ^a
CP	5,22 ± 1,77 ^a
TEB	3,80 ± 0,68 ^a
LUP	0,57 ± 0,22
M+L	1,22 ± 0,35 ^b
C+L	1,78 ± 0,40 ^c
T+L	1,88 ± 0,23 ^d
P_{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP<0,0001 kontrol grubuna göre; ^bP <0,05 malathion grubuna göre; ^cP <0,05 klorprifoz grubuna göre; ^dP <0,005 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 25: Karaciğer Dokusu Reaktif Oksijen Türleri (ROT mg protein⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; **:p<0,005, ***:p<0,0001.

4.3.5. Karaciğer Dokusu LPO Seviyelerine Ait Bulgular

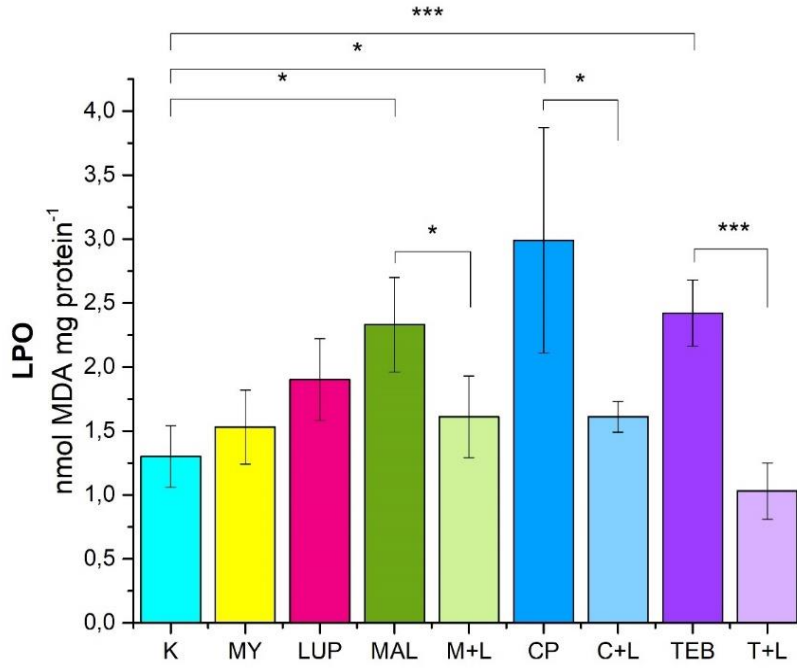
Kontrol ve deney grupları karaciğer dokusuna ait LPO seviyeleri tablo 4.7 ve şekil 4.26’da gösterilmiştir. Tüm gruplara ait LPO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu görülmüştür ($P_{anova} = 0,0001$). Kontrol grubuna lupeol uygulanması ile LPO düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu görülürken ($^aP < 0,05$), kontrol grubuna mısır yağının verilmesi ile LPO düzeylerinde anlamsız bir artış olduğu bulunmuştur. Malathion, klorprifoz ve tebukonazol uygulanan deney gruplarına ait LPO düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu seviyelerin anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($^aP < 0,05$; $^bP < 0,0001$). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol verilmesi ile bu gruplara ait LPO düzeylerinde anlamlı olarak bir azalma olduğu bulunmuştur ($^cP < 0,05$; $^dP < 0,05$; $^eP < 0,0001$).

Tablo 4. 7: Karaciğer Dokusu Lipid Peroksidasyonu

Deney Grubu	Karaciğer Lipid Peroksidasyonu (nmol MDA mg protein ⁻¹)
K	1,30 ± 0,24
MY	1,53 ± 0,29
MAL	2,33 ± 0,37 ^a
CP	2,99 ± 0,88 ^a
TEB	2,42 ± 0,26 ^b
LUP	1,90 ± 0,32 ^a
M+L	1,61 ± 0,32 ^c
C+L	1,61 ± 0,12 ^d
T+L	1,03 ± 0,22 ^e
P _{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP < 0,05 kontrol grubuna göre; ^bP < 0,0001 kontrol grubuna göre; ^cP < 0,05 malathion grubuna göre; ^dP < 0,05 klorprifoz grubuna göre ; ^eP < 0,0001 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 26: Karaciğer Dokusu Lipid Peroksidasyonu (nmol MDA mg protein⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; ***:p<0,0001.

4.3.6. Karaciğer Dokusu GSH Seviyelerine Ait Bulgular

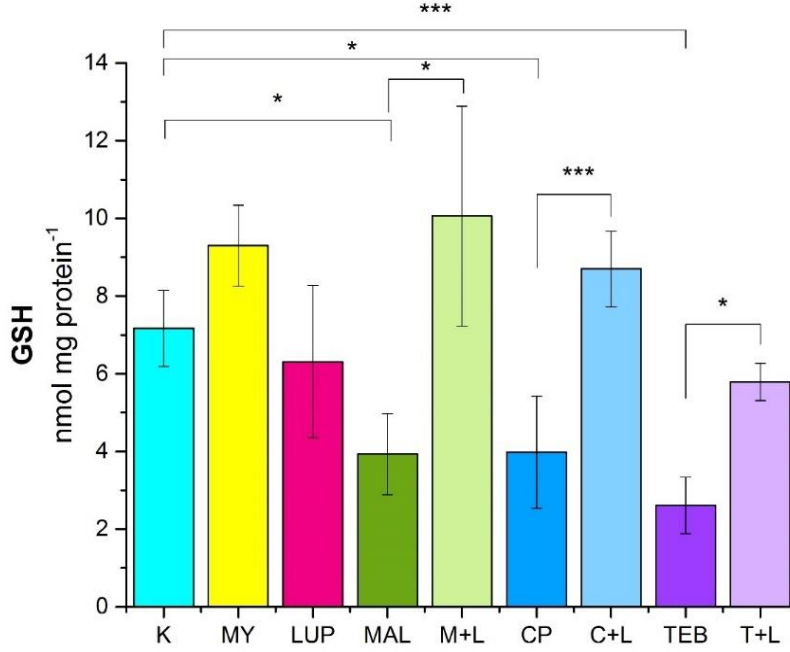
Tüm grupların karaciğer dokusuna ait GSH seviyeleri, tablo 4.8 ve şekil 4.27’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm gruplar arasındaki anlamlılık $P_{anova} = 0,0001$ olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna lupeol uygulanması ile GSH düzeylerinde anlamsız bir azalma gözlemlenirken, kontrol grubuna mısır yağı uygulanmasının ise GSH düzeylerinde anlamlı olarak bir artış meydana getirdiği görülmüştür (^aP < 0,05). Kontrol grubuna malathion, klorprifoz ve tebukonazol uygulanması ile GSH düzeylerinde anlamlı olarak azalma meydana geldiği görülmüştür (^aP < 0,05; ^bP < 0,0001). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol verilmesi ile bu gruplara ait GSH düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur (^cP < 0,05; ^dP<0,0001; ^eP < 0,05).

Tablo 4. 8: Karaciğer Dokusu Glutatyon Seviyeleri

Deney Grubu	Karaciğer Glutatyon Seviyeleri, (nmol GSH mg protein ⁻¹)
K	7,17 ± 0,98
MY	9,30 ± 1,04 ^a
MAL	3,93 ± 1,04 ^a
CP	3,98 ± 1,44 ^a
TEB	2,61 ± 0,73 ^b
LUP	6,31 ± 1,96
M+L	10,06 ± 2,83 ^c
C+L	8,70 ± 0,97 ^d
T+L	5,79 ± 0,48 ^e
P _{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP < 0,05 kontrol grubuna göre; ^bP < 0,0001 kontrol grubuna göre; ^cP < 0,05 malathion grubuna göre; ^dP<0,0001 klorprifoz grubuna göre ; ^eP < 0,05 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 27: Karaciğer Dokusu Glutasyon Seviyeleri, (nmol GSH mg protein⁻¹),
(Ortalama ± Standart sapma) *:p<0,05; ***:p<0,0001.

4.3.7. Karaciğer Dokusu CAT Aktivitesine Ait Bulgular

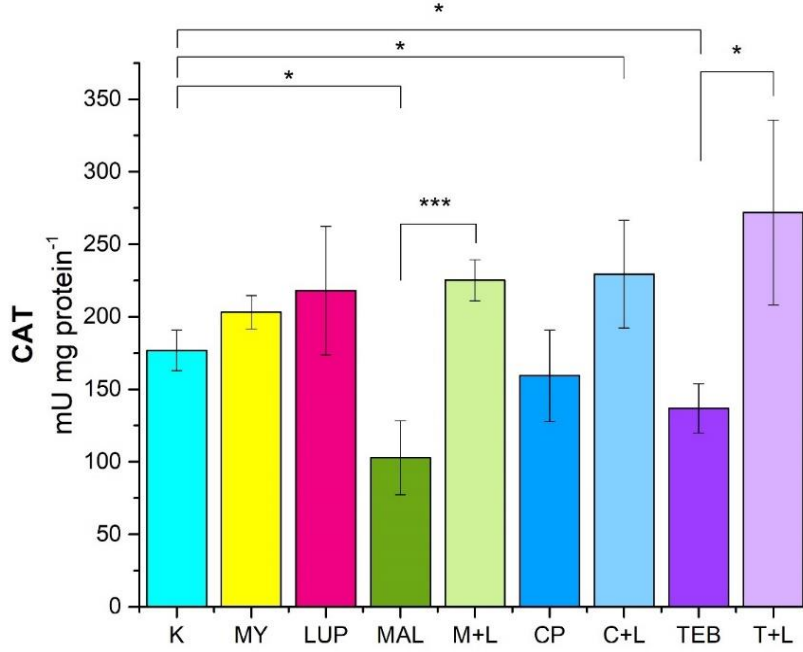
Tüm grupların karaciğer dokusuna ait CAT aktiviteleri, tablo 4.9 ve şekil 4.28’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür ($P_{anova} = 0,0001$). Kontrol grubuna lupeol uygulanması ile CAT aktivitelerinde anlamsız bir artış gözlemlenirken ($P > 0,05$) kontrol grubuna mısır yağı uygulanmasının CAT aktivitelerinde anlamlı olarak bir artış meydana getirdiği saptanmıştır ($^aP < 0,05$). Malathion ve tebukonazol uygulanan deney gruplarına ait CAT aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır ($^aP < 0,05$). Klorprifoz grubuna ait CAT aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır. Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol verilmesi ile CAT aktivitelerinde anlamlı olarak artış olduğu belirlenmiştir ($^bP < 0,0001$; $^cP < 0,05$; $^dP < 0,05$).

Tablo 4. 9: Karaciğer Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi

Deney Grubu	Karaciğer Katalaz Enzim Aktivitesi (mU mg protein ⁻¹)
K	176,78 ± 14,01
MY	203,15 ± 11,38 ^a
MAL	102,80 ± 25,49 ^a
CP	159,37 ± 31,54
TEB	136,90 ± 16,85 ^a
LUP	217,98 ± 44,29
M+L	225,29 ± 14,21 ^b
C+L	229,49 ± 37,14 ^c
T+L	271,97 ± 63,80 ^d
P _{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP < 0,05 kontrol grubuna göre; ^bP < 0,0001 malathion grubuna göre ; ^cP < 0,05 klorprifoz grubuna göre; ^dP < 0,05 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 28: Karaciğer Dokusu Katalaz Enzim Aktivitesi (mU mg protein⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma). *:p<0,05; ***:p<0,0001.

4.3.8. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesine Ait Bulgular

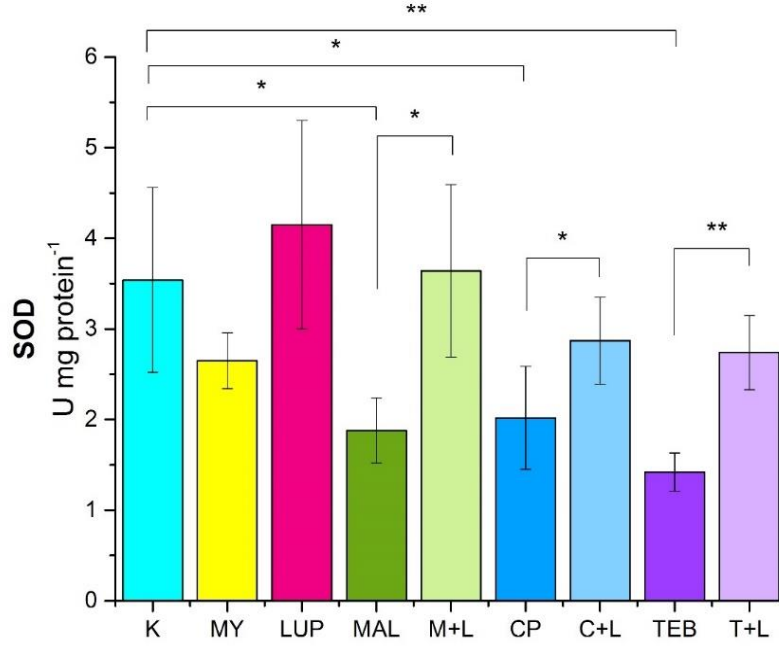
Kontrol ve deney grupları karaciğer dokusuna ait SOD aktiviteleri tablo 4.10 ve şekil 4.29’da gösterilmiştir. Tüm gruplar arasındaki anlamlılık değeri $P_{ANOVA} = 0,0001$ olarak belirlenmiştir. Lupeol uygulanan kontrol grubuna ait SOD aktivitelerinde anlamsız bir artma gözlemlenirken, mısır yağı uygulanan kontrol grubu SOD aktivitelerinin ise anlamsız olarak azaldığı tespit edilmiştir. Malathion, klorprifoz ve tebukonazol uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplara ait SOD aktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir (^bP <0,05; ^aP <0,005). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol kgruplarına lupeol uygulanması ile SOD aktivitelerinde anlamlı bir artma meydana geldiği görülmüştür (^cP <0,05; ^dP <0,05; ^eP <0,005).

Tablo 4. 10: Karaciğer SOD Enzim Aktivitesi

Deney Grubu	Karaciğer SOD Aktivitesi (U g protein ⁻¹),
K	3,54 ± 1,02
MY	2,65 ± 0,31
MAL	1,88 ± 0,36 ^b
CP	2,02 ± 0,57 ^b
TEB	1,42 ± 0,21 ^a
LUP	4,15 ± 1,15
M+L	3,64 ± 0,95 ^c
C+L	2,87 ± 0,48 ^d
T+L	2,74 ± 0,41 ^e
P_{ANOVA}	0,0001

*(Ortalama ± Standart sapma).

^aP <0,005 klorprifoz grubuna göre; ^bP <0,05 kontrol grubuna göre; ^cP <0,05 malathion grubuna göre; ^dP <0,05 klorprifoz grubuna göre; ^eP <0,005 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 29: Karaciğer Dokusu SOD Enzim Aktivitesi (U mg protein⁻¹), (Ortalama ± Standart sapma).
*:p<0,05; **:p<0,005.

4.3.9. Serum TNF- α Seviyelerine Ait Bulgular

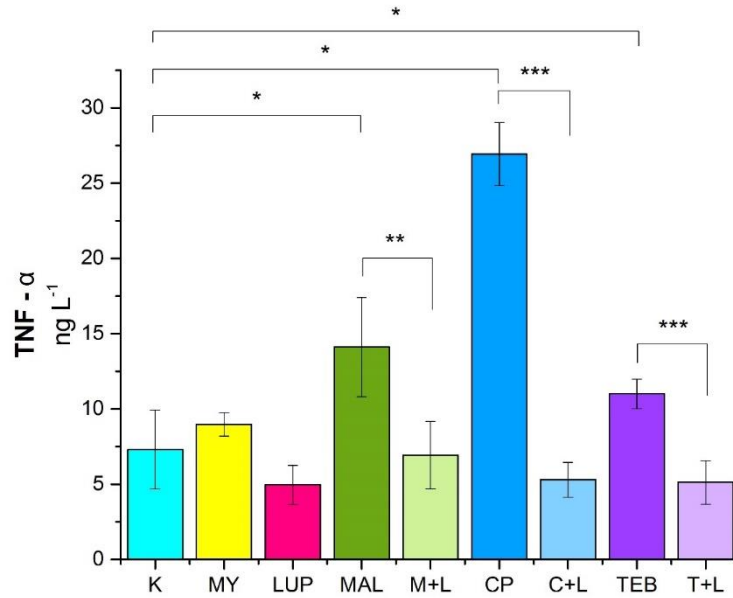
Tüm gruplara ait serum TNF- α seviyeleri, tablo 4.11 ve şekil 4.30’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol ve deney grupları arasındaki anlamlılık değeri $P_{ANOVA} = 0,0001$ olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna lupeol uygulanması ile TNF- α seviyelerinde anlamsız bir azalma meydana gelirken, mısır yağı uygulanması ile bu seviyelerde anlamsız bir artış olduğu saptanmıştır. Malathion, klorprifoz ve tebukonazol uygulanan deney gruplarında TNF- α seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir (^aP <0,05). Malathion, klorprifoz ve tebukonazol gruplarına lupeol verilmesi ile TNF- α seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır (^bP <0,005; ^cP <0,0001; ^dP <0,0001).

Tablo 4. 11: Serum TNF- α Seviyeleri

Deney Grubu	Serum TNF- α Seviyeleri (ng L ⁻¹)
K	7,30 $\pm$ 2,62
MY	8,97 $\pm$ 0,78
MAL	14,11 $\pm$ 3,30 ^a
CP	26,93 $\pm$ 2,10 ^a
TEB	11,00 $\pm$ 0,98 ^a
LUP	4,95 $\pm$ 1,30
M+L	6,93 $\pm$ 2,24 ^b
C+L	5,29 $\pm$ 1,15 ^c
T+L	5,12 $\pm$ 1,44 ^d
PANOVA	0,0001

*(Ortalama $\pm$ Standart sapma).

^aP <0,05 kontrol grubuna göre; ^bP <0,005 malathion grubuna göre; ^cP <0,0001 klorprifoz grubuna göre; ^dP <0,0001 tebukonazol grubuna göre.



Şekil 4. 30: Serum TNF- α Seviyeleri (ng L⁻¹), (Ortalama $\pm$ Standart sapma). *: p<0,05; **:p<0,005;***:p<0,0001.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birleşmiş Milletler tarafından hazırlanan rapora göre şu anda 7,71 milyar olan dünya nüfusunun, 2055 yılı itibariyle 10 milyara, yüzyılın sonunda ise 11,2 milyara yükseleceği tahmin edilmektedir. Artan nüfus ve mevcut tarım arazilerinin üretim kapasitesi karşılaştırıldığında, üretilen gıdanın dünya nüfusunun ihtiyacına yetersiz kalacağı açıktır. Nüfus artışının yanı sıra iklimde meydana gelen değişiklikler sonucunda, tarım arazilerinin bu durumdan olumsuz bir şekilde etkileneceği öngörülmektedir. Bu sebeple, tarımda pestisit kullanımının azalmak yerine giderek artacağı kaçınılmaz gözükmemektedir (Miraglia ve diğ., 2009). Ancak, pestisit kullanımının insan, çevre ve gıda güvenliği açısından değerlendirildiğinde risk oluşturduğu yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur (Garcia ve diğ., 2016; Meftaul ve diğ., 2020).

Türkiye’de 2007 verilerine göre 48,000 ton olan pestisit kullanımı, 2018 yılı sonu verilerine göre 55,000 tona çıkmıştır. Pestisit kullanımında birçok Avrupa ülkesinin gerisinde olunsa bile, görüldüğü gibi Türkiye’de pestisit kullanımı yıldan yıla giderek artış göstermektedir (Tiryaki ve diğ. 2010). Tek problem pestisit kullanımındaki artış değildir; aynı zamanda Türkiye’de kullanılan pestisitlerin toksisitesi de önemli bir sorundur. Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri, çevresel etkisi daha düşük ve biyota üzerinde daha az toksik pestisitleri tercih ederken, Türkiye’de kullanılan pestisitlerin toksisitesi ve çevre ile uyumu dikkate alınmamaktadır.

Kuşkusuz pestisit kullanımında en fazla zarar gören meslek grupları, çiftçiler, tarım işçileri ve ilaçlama yapan çalışanlar ile tarım arazilerinin çevresinde ikamet eden insanlardır. Ayrıca, çoğu pestisit gıdalara püskürtülerek uygulanmakta ve bu besinlerin tüketilmesiyle pekçok kişi pestisitlere maruz kalmaktadır (Çobanoğlu ve diğ., 2020). Ülkemizde yaygın olarak kullanılan pestisit çeşitlerinden biri de organofosforlu pestisitlerdir ve bunlar önemli nörotoksik ajanlardır. Sadece hedef organizmaya spesifik hareket etmezler. Dolayısıyla tüm canlılar için risk oluşturmaktadırlar. OP’lerin etki mekanizması, AChE enzimini inhibe ederek kolinergik sistemin aşırı uyarılması sonucu canlıyı felç etmektir (Costa, 2017). Ayrıca yapılan *in vivo* çalışmalar ile akut ve kronik olarak organofosforlu pestisitlere maruz kalmanın, B ve T lenfositleri ile NK hücrelerinin canlılığı ve fonksiyonu üstünde zararlı etkilere sahip olduğu,

böylelikle pestisitlerin önemli immünotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Noworyta ve diğ., 2014; Lee ve Choi, 2020).

Karaciğer, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynadığı için pestisit gibi zararlı kimyasallardan ilk etkilenen organların başında gelmektedir. Birçok pestisit karaciğer sitokrom p450 enzimleri tarafından biyotransformasyona uğramaktadır. Bu detoksifikasyon sürecinin ilk adımındır. Sitokrom p450'ler monooksijenaz enzim sistemidir ve bir substrata (organofosfat) bir molekül oksijen atomu ekleyerek oksidasyonunu sağlar. Bu reaksiyonun sonucunda organofosforlu pestisitlerden meydana gelen metabolitler çok daha toksik etkiye sahiptir. Sürekli antioksidan gereksinimi sağlanamazsa bu metabolitler antioksidanların tükenmesine böylelikle antioksidan dengenin bozularak oksidatif hasarın oluşmasına sebep olur. Epidemiyolojik araştırmalar, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların azalan bu antioksidan kapasiteyle bir ilişkisi olduğuna işaret etmektedir (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Ayrıca OP'lerin hidrolize edilmesinden sorumlu olan enzim, paraoksonaz (*PON1*) geni tarafından kodlanan A-esterazdır. Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara yakalanma ihtimalinin *PON1* geninin polimorfizmine sahip kişilerde daha yüksek olduğu ve bu genin aktivitesinin OP maruziyetinde artış gösterdiğine dikkat çekilmiştir (Mostafalou ve Abdollahi, 2018).

Literatürde pestisitlere kısa veya uzun dönem maruz kalmanın karaciğerde oksidatif hasarı arttırarak, histopatolojik değişimlere ve DNA hasarına sebep olduğuna işaret eden birçok çalışma vardır (Karami-Mohajeri ve diğ., 2017). Oksidatif stres karaciğerde patolojik bir sürecin başlamasına ve ilerlemesine zemin hazırlamaktadır. Jacobsen-Pereira ve diğ. (2018) pestisit ilaçlaması yapan elli kişi üstünde yaptıkları araştırmada, pestisite kronik olarak maruz kalmanın sonucunda Comet analizi ile belirlenen DNA hasarının ve oksidatif stres belirteçlerinin arttığına işaret etmişlerdir. Azmi ve diğ. (2006)'da Pakistan'da ilaçlama yapan seksen üç işçiden aldıkları kan örnekleriyle yaptıkları çalışmada, pestisit kalıntıları ile ALP enzimi düzeylerindeki artış arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. ALP yüksekliği karaciğer hasarı, kanser gibi hastalıklarda yüksek düzeylerde seyretmektedir.

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan karaciğer hasarında, uygulanan antioksidanların, serbest radikal süpürme yetenekleri sayesinde, karaciğerde iyileştirici veya koruyucu etkileri olduğunu ortaya koyan deneysel çalışmalar mevcuttur (Li ve diğ., 2015). Örneğin, Elzoghby ve diğ., (2014) malathion ile hasar oluşturulmuş sıçanlara tedavi amacıyla C vitamini ve yeşil çay

ekstratı uygulamışlardır ve sonuçta karaciğerde artan MDA seviyelerinin azaldığını, bozulan antioksidan dengenin ise düzeldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, pestisit ile oluşturulan oksidatif hasarın A vitamini, E vitamini, çinko, selenyum, aleo vera ve zencefil gibi çeşitli bitki ekstratları kullanılması sonucu azaldığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Mansour ve Mossa, 2010; Shokrzadeh ve diğ., 2012; Ma ve diğ., 2013).

Bu tez çalışmasında, pestisitlerin sebep olduğu karaciğer oksidatif hasarına karşı çeşitli meyve ve sebzelerden elde edilen bir antioksidan olan lupeolün etkileri araştırılmıştır. 50 mg kg⁻¹ malathion (Fortunato ve diğ., 2006), 10 mg kg⁻¹ klorprifoz (Tanvir ve diğ. 2016) ve 50 mg kg⁻¹ tebukonazol (Taxvig ve diğ., 2007) olmak üzere üç farklı pestisit gavaj yolu ile 10 gün boyunca sıçanlara uygulanmıştır. Aynı dozlarda pestisit uygulanan diğer üç gruba ise 10 mg kg⁻¹ lupeol kombine şekilde gavaj yolu ile verilmiş ve karaciğer dokusu üzerinde iyileştirici ve/veya koruyucu etkisini belirlemek amacıyla, histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizler uygulanmıştır. Lupeol, son zamanlarda özellikle apoptozu düzenleyici rolü ile dikkat çeken ve artan bir ilgiyle farmakolojik özellikleri araştırılan pentasiklik yapıda lupan tipi, mango, siyah çay, havuç, salatalık, kuru üzüm ve biber gibi pek çok bitkide bulunan bir triterpen türevidir (Gallo ve Sarachine, 2009). Lupeolün anti mikrobiyal, anti inflamatuvar ve antioksidan özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı araştırılmaktadır (Gallo ve Sarachine, 2009).

Pestisitler ve karaciğerdeki toksisiteleri üzerine yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda morfolojik değişimlerin gözlemlendiğini belirten çalışmalardan birinde, Kalender ve diğ., (2010) 28 gün boyunca 27 mg kg⁻¹ malathion uyguladıkları sıçanlarda karaciğer dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu, hiperemi, nekroz, sinüzoidlerde genişleme ve vasküler konjesyon gibi histopatolojik bulgular gözlemlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise 50 mg kg⁻¹ malathion verilen sıçan karaciğer dokusunda portal vende konjesyon ve fibrozis, piknotik nükleus ve vakuolizasyon gibi histopatolojik değişimler tespit edilmiştir (Aboubakr ve diğ., 2019). Değişen dozlarda 30 gün boyunca malathion uygulanan sıçanlarda folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve testosteron hormon seviyelerinin kontrole kıyasla önemli ölçüde düştüğü ve testis dokusundaki histolojik incelemelerde çoğu seminifer tübülde apoptotik hücreler, piknotik nükleus ve lümende bulunan spermatozoa sayısında azalma rapor edilmiştir (Slim ve diğ., 2016). Tripathi ve Srivastav (2010), 5 mg kg⁻¹ ve 10 mg kg⁻¹ olmak üzere 2 farklı dozda verdikleri klorprifozun 2, 4, 6 ve 8 haftalık zaman aralıklarında

sıçan karaciğeri üstünde yaptıkları mikroskopik incelemede sinüzoidlerde genişleme, hepatositlerde dejenerasyon, nüklear dejenerasyon, mono nüklear hücre infiltrasyonu, hiperkromatik ve hipertrofik nükleus bulguları saptamışlardır. Klorprifozun karaciğer morfolojisi üstünde yarattığı hasarı göstermek için yapılan bir başka çalışmada ise sinüzoidlerde genişleme, nekrotik hücre, mono nüklear hücre infiltrasyonu, vakuolizasyon ve ödem tespit edilmiştir (Ezzi ve diğ., 2016). Triazol grubu fungusitlerin, hepatosellüler vakuolizasyonu, lizozomlarda aşırı fosfolipit birikimi ile karakterize fosfolipidozu ve karaciğer yağlanması tetiklediği bildirilmiştir (Knebel ve diğ., 2019). Triazol grubu bir pestisit olan tebukonazolün 30 gün boyunca 100 mg kg⁻¹ uygulandığı sıçan karaciğer dokularında lökosit infiltrasyonu, vakuolizasyon ve nekrozis gibi histopatolojik bulgular rapor edilmiştir (Saad ve diğ., 2017).

Çalışmamızda klorprifoz, malathion ve tebukonazol uygulanan sıçan karaciğerlerinde hepatosit ışınsal diziliminde bozulma, vasküler konjesyon, sinüzoidlerde genişleme, mononüklear hücre infiltrasyonu, hiperemi, nekrotik hepatositler, vakuolizasyon, eozinofilik hücre ve piknotik nükleus, fibrozis gibi literatür ile paralel hasar bulguları tespit edilmiştir. Ayrıca metotreksat ile hasar oluşturulmuş sıçan karaciğerinde (Kanel, 2007), diyabet hastalarının karaciğer biyopsilerinde ve alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanmasında (Abraham ve Furth, 1994) hasar bulgusu olarak gösterilen nüklear vakuolizasyonun varlığı, bu çalışmada pestisit verilen bütün gruplarda görülmektedir.

Literatürde, lupeolün hepatoprotektif rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, aflatoksin verilerek karaciğer histolojisinde dejeneratif değişimlerin gözlemlendiği; aflatoksin ve lupeolün birlikte verildiği gruplarda ise karaciğer hasarının azalmış olduğu gösterilmiştir (Preetha ve diğ., 2006). Yine bir başka çalışmada, n-asetil-p-aminofenol ile oluşturulan karaciğerdeki doku hasarına etkisi araştırılan lupeolün, vakuolizasyon, hiperkromazi ve hepatik lezyonları azalttığı tespit edilmiştir (Kumari ve Kakkar, 2012).

Bu çalışma, pestisitler ile oluşturulan oksidatif karaciğer hasarına karşı lupeolün koruyucu ve/veya iyileştirici etkilerinin incelendiği ilk *in vivo* çalışma olması sebebiyle orijinal bir araştırmadır. Bu çalışmanın sonucuna göre, biz de literatürle paralel olarak, pestisitlerin karaciğerde meydana getirdiği histopatolojik hasar bulgularının, lupeol verilen gruplarda çok daha az olduğunu ve iyileşme görüldüğünü söyleyebiliriz. Lupeol verilen tüm pestisit gruplarında özellikle hepatosit ışınsal diziliminin kontrole yakın bir görünüm sergilediği,

piknotik nükleus, vasküler konjesyon, sinüzoidlerde genişleme, nüklear vakuolizasyonun, fibrotik ve nekrotik alanların azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak lupeolün, pestisitlerin oluşturduğu histopatolojik hasara karşı karaciğer dokusu üzerinde koruyucu bir etki yaptığını söyleyebiliriz.

Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini göstermesinden dolayı, hücre çoğalma indeksinin belirlenmesi amacıyla PCNA proteininin immünohistokimyasal olarak saptanması sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Sheen-Chen ve diğ., 2003). Yaptığımız çalışmada da, karaciğer dokusunda proliferasyondaki değişimleri belirlemek amacıyla, hücre nükleus antijeni olan PCNA proteini immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir. Nükleik asit metabolizmasında, PCNA'nın en iyi anlaşılan görevi, DNA replikasyonunda oynadığı roldür; o yüzden hücre proliferasyonunun göstergesi olarak hücrede PCNA'nın çeşitli yöntemlerle değerlendirilmesi tercih edilmektedir. PCNA hücre siklusunun G1 evresinde sentezlenmeye başlamaktadır ve pik noktasına sentez evresinde ulaşmaktadır (Kelman, 1997). G2 evresinde ise PCNA miktarı düşüş göstermektedir; fakat sürekli bölünen hücrelerde hücre siklusu boyunca PCNA az da olsa eksprese edilmektedir. Bunlara ek olarak PCNA'nın hücre siklusu boyunca, kontrol noktalarındaki proteinlerle etkileşime girdiği ve bu nedenle hücre regülasyonunda öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Kelman, 1997; Muskhelishvili ve diğ., 2003). Karaciğerde PCNA pozitif hücre sayısındaki artışın bir hasar göstergesi olduğu düşünülmektedir. Tebukonazol benzeri azol grubu fungusitler ile muameleden sonra, ilk 30 güne kadar, karaciğer PCNA düzeylerinin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Wolf ve diğ., 2006). Bingül ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada, karaciğer için toksik olduğu bilinen N-diethilnitrosamin verilen sıçanlarda, PCNA pozitif hücre sayısının artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Saggu ve diğ. (2014) çeşitli endüstriyel temizleyicilerde bulunan bir kirletici olan 4-tert-octylphenol'un verildiği sıçanlarda, MDA seviyelerinde yükselme, antioksidan enzim düzeylerinde ise düşüş gördüklerini, bu artan oksidatif hasara paralel olarak karaciğer PCNA pozitif hücre sayısında da yükselmenin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışma ile, klorprifoz verilen sıçanların süt bezlerinde ve DDT verilen sıçanların karaciğer hücrelerinde yüzde PCNA pozitif hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır (Harada ve diğ., 2016; Ventura ve diğ., 2016). Malathionun sıçanlarda meme bezlerinde karsinogeneze yol açtığı ilk kez Cabello ve diğ. (2001) tarafından gösterilmiştir. Birçok karsinogenin hücre proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Örneğin, hepatosellüler karsinoması olan 76 hasta üstünde yapılan araştırmada PCNA ekspresyonlarında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (Ma ve diğ., 2016).

Bu çalışma kapsamında da organofosforlu ve triazol grubu pestisitlerin, karaciğer PCNA düzeylerinde anlamlı bir artışa yol açtığı görülmekte ve bu sonuç, pestisit maruziyetinin karaciğerde neoplastik değişimleri tetikleme potansiyeli taşıyabileceğini düşündürmektedir.

Lupeol, son zamanlarda farmakolojik etkileri çokça araştırılan ve birçok kanser türünde fayda sağladığı görülen klinik öneme sahip bir antioksidandır. Lupeolün karaciğer kanseri, prostat kanseri ve cilt kanseri modelleri üstünde anti-kanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Prasad ve diğ., 2007, 2018; Nigam ve diğ., 2009). Lupeolün anti kanser aktivitesi Liu ve diğ. (2015) tarafından araştırılmıştır. Bu araştırmacılar çalışmalarında pankreas kanser hücre hattını BALB/c farelere enjekte etmişlerdir. Lupeol ile tedaviden sonra farelerde PCNA ekspresyonunun azaldığını, apoptozun indüklendiğini bildirmişlerdir. Böylelikle tümörün gerilediğini ve lupeolün anti-kanser etkisi olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da, pestisit ve lupeol verilmiş gruplarda PCNA düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmektedir. Bu sonuç, lupeolün olası bir pestisit hasarı sonrasında oluşabilecek karsinojenik etkiler açısından önleyici bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Organofosforlu pestisitlerin spesifik hedefi AChE enzimidir ve organofosforlu pestisitler enzimin inhibisyonuna sebep olmaktadır. Bu sebeple AChE enzimi organofosforlu pestisit zehirlenmelerinde bir biyobelirteç olarak kabul görmektedir. AChE, bir nörotransmitter olan asetilkolinin yıkımından sorumlu, sinir sisteminin önemli bir enzimidir. Özellikle nöromuskular kavşakta ve kolinerjik sinapslarda bulunan AChE, kolinerjik sinapsların uyarılmasını sağlayan asetilkolin nörotransmitterini hızlı bir şekilde hidrolize ederek asetat ve koline yıkımını sağlamaktadır. Karaciğerde metabolize olan organofosforlu pestisitler AChE'nin aktif bölgesindeki serin aminoasidine kovalent bağ ile bağlanır ve böylelikle asetilkolinin bağlanmasını engelleyerek enzimi inaktifleştirir. Sinapslarda artan asetilkolin, post-sinaptik nöron veya kas hücresinin sürekli uyarılmasına sebep olur. Bu durumda, sonuçta canlıyı felce uğratarak ölümüne sebep olabilmektedir (Lionetto ve diğ., 2013). Organofosforlu pestisitlere akut ve kronik maruziyetin, AChE enzim aktivitesini inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma vardır. Pestisite maruz kalmış ve hayatında hiç pestisite maruz kalmamış toplam 134 çiftçi üzerinde yapılan karşılaştırmalı bir çalışmanın sonuçlarına göre, pestisit maruziyetinde serum AChE aktivitelerinde önemli bir düşüş, inflamasyonda artış ve DNA hasarı tespit edilmiştir (Taghavian ve diğ., 2016). Yapılan bir başka çalışmada pestisit ilaçlaması yapan işçilerdeki AChE inhibisyonu ve depresyondan intihara kadar değişen geniş spektrumda nöropsikiyatrik

hastalıklara yakalanma riski arasında paralellik olduğu ortaya konulmuştur (Serrano-Medina ve diğ., 2019). Khadairi ve diğ. (2018) sıçanlara üç hafta boyunca verilen 50 mg kg⁻¹ malathionun, karaciğer AChE aktivitesini önemli derecede azalttığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada 76 mg kg⁻¹ klorprifozun uygulandığı sıçanlardaki AChE enzim aktivitesinin değişimi 24, 48 ve 72. saatin sonunda incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda karaciğer, böbrek ve serum AChE aktivitelerinin giderek azalan bir grafik çizdiği görülmüştür (Sharma ve diğ., 2019). Ayrıca yapılan çalışmalarla klorprifoz ve malathiona kronik maruziyetin, serum AChE aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür (John ve diğ., 2001; Uchendu ve diğ., 2017). Tebukonazol triazol grubu bir pestisit olmasına rağmen, AChE enzim aktivitesini azalttığına dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Tebukonazolun 0.9, 9 ve 27 mg kg⁻¹ olacak şekilde farklı dozlarının uygulandığı bir çalışmada, kalp AChE aktivitesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Othmène ve diğ., 2020).

Bu yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre, pestisit uygulanan bütün gruplarda hem karaciğer dokusunda hem de serumda AChE aktivitelerinde önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir. Lupeol ve pestisit birlikte uygulandığında ise, lupeolün karaciğer ve serumda AChE aktivitelerinde yükselme meydana getirdiği görülmektedir. AChE düzeylerinin belirlenmesi için kullandığımız Elisa testi sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu bulgumuzu destekler nitelikte bir çalışmada, farklı dozlarda malathion (100, 200 ve 400 mg kg⁻¹) uygulanan sıçanlarda, Elisa ile belirlenen AChE değerleri arasında fark gözlenmemiştir (Severcan, 2016). Pestisitlerin AChE aktivitesi üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu, fakat pestisitler etkisiyle AChE enziminin yapısal olarak bozulmadığını ve miktar olarak değişmediğini söylemek mümkündür. AChE aktivitesinin düşmesinin AChE miktarının azalmasıyla ilişkisi olmadığını, pestisitlerin AChE enzime doğrudan bağlanarak inaktivasyonuna sebep olduğunu söyleyebiliriz. Lupeolün, pestisit verilen gruplardaki AChE aktivitelerini arttırması, AChE enzim inhibisyonu ile oluşabilecek olumsuz etkileri azaltabileceğini göstermektedir.

İnflamasyon doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir parçası olmakla birlikte birçok adımda düzenlenen kompleks bir süreçtir. TNF- α , makrofajlar veya monositler tarafından üretilen, inflamasyonun başlamasında etkili bir sitokindir. Ayrıca TNF- α 'nın, farklılaşma, apoptoz, nekroz ve proliferasyon gibi hücrede çeşitli fizyolojik rolleride bulunmaktadır (Akash ve diğ., 2018). Lipopolisakkaritler başta olmak üzere bakteri, virüs ve tümör hücreleri gibi birçok

uyarana cevaben TNF- α sentezi artış göstermektedir. TNF- α 'nın düşük seviyelerde bulunması hücreler için koruyucu etki gösterirken, yüksek düzeylerde bulunması doku hasarıyla sonuçlanmaktadır (Çayakar, 2018). Navaei ve diğ. (2018) yapmış oldukları *in vitro* çalışmada, sağlıklı bireylerden alınan lenfosit kültürüne 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$ klorprifoz uygulanması sonucu TNF- α seviyelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Akut malathion zehirlenmesi ile hastaneye başvuran 35 hastadan alınan kan örnekleriyle yapılan çalışmada TNF- α seviyelerinde önemli derecede artış saptanmıştır (Seth ve diğ., 2008). Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre pestisit verilen bütün gruplarda TNF- α düzeylerinde anlamlı bir artış görülmektedir. Pestisitlerin etkisi sonucu ROT'daki artışın TNF- α düzeylerini de arttırarak inflamasyona sebep olduğunu ve immüntoksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Lupeolün biyolojik olarak birçok rolü olduğu bilinmektedir ve bunlardan biri de çeşitli araştırmalarla ispatlanmış olan anti-inflamatuar etkisidir. Lupeolün, inflamasyona sebep olan çeşitli yollar üzerine etki ederek, inflamatuvar süreçte rol oynayan moleküllerle doğrudan veya dolaylı olarak müdahalesinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Saleem, 2009). Bu çalışmalardan birinde, akut inflamasyon oluşturulan farelere *Pimenta racemosa* ekstratından elde edilen lupeolün uygulanması sonrası, TNF- α ve IL-1 düzeylerinin düştüğü ve bu sayede lupeolün pro-inflamatuar moleküllerin seviyelerini azaltarak inflamasyonu önlediğini ortaya konmuştur (Fernández ve diğ., 2001). Yapılan bir başka *in vivo* çalışmada yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen sıçanlarda serum TNF- α seviyelerinin arttığı fakat lupeol uygulanmasıyla TNF- α düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalmaya sebep olarak; TNF- α 'nın düzenlenmesinde görevli olan ve birçok tümörün gelişimi ve ilerlemesinde rolü olduğu düşünülen nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin inhibisyonunun olduğu gösterilmiştir (Sudhakar ve diğ. 2007).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, pestisit gruplarına lupeol uygulanmasıyla bütün gruplarda TNF- α düzeylerinde azalma görülmüştür. Lupeolün, TNF- α üzerine etki ederek pestisit hasarıyla oluşabilecek inflamasyonu azaltabileceğini düşünmekteyiz.

Serbest radikaller hücrenin metabolizması sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Kararsız yapıda olduklarından hücredeki makromoleküllere saldırarak yapılarına zarar vermekte ve böylece kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol almaktadırlar. Hücrede bulunan antioksidanlar, ROT'un meydana getirdiği hasarları önlemek için vücudun oluşturduğu ilk savunma hattıdır. Hücrede; pestisit, radyasyon, ağır

metaller, çeşitli ilaçlar ROT miktarındaki artışa sebep olmakta ve antioksidan miktarlarının yetersiz kalması oksidatif hasarla sonuçlanmaktadır. Örneğin *in vitro* çalışmalardan birinde, fare timosit hücrelerine malathion ve permetrin pestisitlerinin uygulanması sonrasında ROT seviyelerinde ciddi bir yükselme olduğu saptamıştır (Olgun ve Misra, 2006). Mostafalou ve diğ. (2012) sıçanlardan izole ettikleri karaciğer hücrelerine malathion uygulamasıyla, ROT seviyelerinde anlamlı bir artış görmüşlerdir. Yapılan *in vivo* bir çalışmada; 20, 50 ve 100 mg kg⁻¹ dozlarda akut, 2 ve 4 mg kg⁻¹ dozlarda kronik klorprifoz uygulamasına maruz kalan sıçanlarda hem beyin hem de karaciğerde ROT miktarının artış gösterdiği görülmüştür (Mehta ve diğ. 2009). Zebra balığının larvaları üstünde yapılan bir çalışmada, tebukonazolun maksimum lethal olmayan ve LC₁₀ dozlarının uygulanması sonucu ROT seviyelerinde artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Li ve diğ., 2020). Kumari ve Kakkar (2012) sıçanlara n-asetil-p-aminofenol verildiğinde ROT seviyelerinde artışa sebep olarak bununla paralel oksidatif hasarın arttığını; lupeol uygulanması sonrasında ROT seviyelerinin önemli ölçüde düştüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, pestisit verilen bütün gruplarda karaciğer ROT seviyelerinde ciddi derecede artış görülmüştür. Pestisit gruplarında, pestisitlerin meydana getirdiği ROT'u düzenlemede antioksidan miktarlarının yetersiz kaldığı görülmektedir. Lupeol + pestisit gruplarında ise ROT seviyelerinin kontrol düzeylerine yaklaşırsa bile önemli ölçüde düşüş göstermesi lupeolün antioksidan etkisinin sonucudur.

Çalışmamızda pestisit uygulanması sonucu karaciğerde ortaya çıkan oksidatif hasarın varlığı lipid peroksidasyonu düzeyleri saptanarak ortaya konmuştur. Lipid peroksidasyonunda, özellikle doymamış yağ asitlerinin bozulması ile zincirleme bir reaksiyon meydana gelmektedir. Lipid peroksidasyonunun artması, eritrositler, karaciğer ve böbrek gibi organların fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarında bozulmalara sebep olabilir (Uchendu ve diğ., 2012). Canlıların maruz kaldığı klorprifoz ve malathion gibi pestisitlerin, hücrelerin lipofilik yapıları sebebiyle lipid peroksidasyonu düzeylerini arttırarak oksidatif hasara yol açmaları olasıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda açığa çıkan MDA oksidatif hasarın ana belirtecidir. Serbest radikallerin artışı ile doğru orantılı olarak MDA seviyeleri de artış göstermektedir ve lipid peroksidasyonunun derecesi MDA düzeyleri ölçülerek belirlenmektedir. Ranjbar ve diğ. (2002) organofosforlu pestisit ilaçlaması yapan 45 işçi üzerinde yaptıkları çalışmada, oksidatif stres belirteci olan MDA seviyelerinin kontrol bireylere kıyasla yükseldiğini, antioksidan kapasitenin ise azaldığını göstermişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, sıçanlara 200 mg kg⁻¹ malathion uygulanması sonrasında MDA seviyelerinin,

karaciğer dokusunda kontrole kıyasla %50 oranında arttığı gösterilmiştir (Dhouib ve diğ., 2015). Bu çalışmalara benzer şekilde, klorprifoz ve tebukonazol verilen sıçanlarda karaciğerde MDA seviyelerinin anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır (Mansour ve diğ. 2011; Saad ve diğ., 2017). Xu ve diğ. (2017) yapmış oldukları çalışmada çevresel dozlarda klorprifozu tek başına ve kadmiyumla birlikte 3 ay boyunca gavaj yoluyla sıçanlara vermişlerdir. Çalışmanın sonucunda, klorprifoz hem tek başına uygulandığında hem de kadmiyumla birlikte verildiğinde beyinde lipid peroksidasyonunun ve aynı zamanda oksidatif protein hasarında ortaya çıkan protein karbonillerinin artış gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmamızda da karaciğerde, ROT artışıyla paralel olarak, lipid peroksidasyonu seviyelerinin pestisit verilen gruplarda kontrole kıyasla anlamlı derecede yükseldiği, pestisit gruplarına uygulanan lupeolün ise lipid peroksidasyonu düzeylerini önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir. Lupeolün, ROT seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu azaltması sonucu oksidatif hasarın da derecesini azalttığını düşünmekteyiz.

Canlı yapılarda meydana gelen oksidatif hasarın onarılması için enzimatik ve enzimatik olmayan pek çok savunma şekli vardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar grubuna giren GSH hem ksenobiyotiklerin hem de endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. GSH'nin sitozolik konantrasyonları $O_2\bullet$, $NO\bullet$ ve $OH\bullet$ gibi ROT türlerinin direkt olarak süpürülmesinde görevlidir. GSH, hücre içindeki makromoleküllerin (DNA, protein, lipid) oksitleyici ajanlara karşı korunmasında görevlidir. Pestisit ile maruziyet sonucunda hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, GSH'nin antioksidan aktivitesinin negatif olarak etkilendiğini göstermiştir. Akbel ve diğ. (2018) sıçanlarda malathion maruziyetinden sonra, kan, karaciğer, böbrek, kalp ve beyin dokularında GSH miktarının önemli ölçüde düştüğünü gözlemlemişlerdir. Yang ve diğ., (2018) sıçanlara 50 mg kg^{-1} tebukonazol uygulanması sonucunda GSH seviyelerinde düşme olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada ise artan lipid peroksidasyonuyla birlikte GSH seviyelerinin düşüş gösterdiği ifade edilmiştir (Goel ve diğ., 2005).

Lupeolün antioksidan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada streptozotosin enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş sıçanların pankreas dokusu incelenmiştir. Diyabetik sıçanların pankreasında MDA seviyelerinde artış ile GSH, CAT, SOD ve GST antioksidan seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Diyabetik sıçanlara lupeol tedavisinden sonra, MDA miktarında önemli bir azalma ve antioksidan seviyelerinde önemli ölçüde düzelmeler bildirilmiştir (Gupta ve diğ., 2012).

Lupeolün hepatoprotektif rolünü ortaya koyan çalışmalardan birinde, sıçanlara uygulanan ve toksik etkisi bilinen kadmiyumun karaciğerde artan LPO seviyeleri ve azalan antioksidan enzim aktivitelerine neden olduğu tespit edilmiştir. Lupeol uygulanması sonucunda GSH seviyelerinde ve SOD, CAT enzim aktivitelerinde artış saptanmıştır (Sunitha ve diğ, 2001).

Bu tez çalışmasının sonucuna göre, pestisit verilen bütün gruplarda GSH seviyelerinde önemli ölçüde azalma, bununla paralel olarak MDA seviyelerinde artış görülmektedir. GSH'nin hücre içindeki konsantrasyonlarının azalmasının sebebi oksidatif stres sonucu artan kullanımından kaynaklıdır. Hücre içindeki GSH azlığının, hücreyi ölüme götürecek yolları indüklediği gösterilmiştir (Circu ve Aw, 2012). Çalışmamızda, lupeolün pestisit gruplarıyla birlikte verildiğinde, GSH seviyelerini yükselttiği görülmüştür. Bu sonuçlar, lupeolün antioksidan etki ile karaciğer oksidatif stresini azaltarak, GSH seviyelerinde yükselmeye sebep olduğunu göstermektedir.

Lupeolün protektif etkisini araştırdığımız bu çalışmada, incelenen antioksidan enzimlerden biri olan katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene indirgenmesinde görev almaktadır. Gupta ve diğ., (2019) sıçanlara malathion uygulaması sonrasında karaciğer CAT aktivitelerinde ciddi bir düşüş gözlemlemişlerdir (Gupta ve diğ., 2019). Çalışmamızda, malathion ve tebukonazol gruplarında, CAT aktivitesinde kontrol bireylere göre anlamlı bir azalma; klorprifoz verilen gruba ait CAT aktivitelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma olduğunu tespit ettik. Prasad ve diğ. (2007) kanserojen bir madde olan 7,12-dimetilbenz (a)antrasen (DMBA) ile oksidatif hasar oluşturulmuş sıçanlara 7 gün boyunca 25 mg kg⁻¹ lupeol enjekte etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, lupeol verilen sıçanlarda, karaciğerde LPO'nun azaldığı ve SOD, CAT gibi antioksidan seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre de pestisit gruplarına lupeol uygulaması ile CAT aktivitelerinin artış gösterdiği görülmektedir.

SOD, süperoksit anyonunun oksijen ve hidrojen perokside dönüşümünde rol oynayan ve çeşitli reaktif oksijen türlerinin seviyelerini kontrol altında tutan önemli bir enzimdir. SOD aktivitesinin pestisit maruziyetinden nasıl etkilendiğine dair yapılan çalışmalardan birinde, pestisit ilaçlaması yapan işçilerden alınan kan örneklerinde hem yüksek hem de düşük doz organofosforlu pestisite maruziyetin SOD aktivitelerini düşürdüğü bildirilmiştir (López ve diğ., 2007). Khan ve diğ. (2005) yapmış oldukları bir çalışmada klorprifoz ve başka bir insektisit olan sipermetrinin birlikte verildiği sıçan karaciğerinde SOD aktivitesinde %50

oranında azalma gözlenmiştir. Saad ve diğ. (2017) 30 gün boyunca 100 mg kg⁻¹ tebukonazol uygulanması ile sıçanların karaciğer SOD aktivitelerinde önemli ölçüde azalma gördüklerini bildirmişlerdir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre, literatür ile uyumlu şekilde pestisit verilen bütün gruplarda SOD aktivitelerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. SOD aktivitesinin azalması, özellikle hücre zarının yapısal proteinleri ve çoklu doymamış yağ asitleri için toksik etkisi olan süperoksit radikalini arttırarak, lipid peroksidasyonunda yükselmeye sebep olmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitelerinin, pestisit gruplarına lupeol uygulanması sonrasında artış gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara, benzer sonuçların elde edildiği çalışmalarda örneğin, aflatoksin ve kadmiyum ile hasar oluşturulan sıçan karaciğer dokusunda SOD aktivitesinin lupeol uygulanması sonrası artış gösterdiği belirlenmiştir (Sunitha ve diğ., 2001; Preetha ve diğ., 2006). Lupeolün pestisit ile azalan SOD aktivitelerinde meydana getirdiği yükselme, süperoksit anyonu ile oluşabilecek hasarları ortadan kaldırabilir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları kısaca özetleyecek olursak;

- Pestisit verilen bütün gruplardaki bireylerde karaciğerin normal morfolojik görünümünden uzaklaştığı, hiperemi, vasküler konjesyon, piknotik nükleus, sinüzoidlerde genişleme ve mononükleer hücre infiltrasyonu başta olmak üzere çeşitli hasar bulguları saptanmıştır. Lupeol ile tedavi sonrasında karaciğerde pestisit hasarı ile meydana gelen histopatolojik hasarın azaldığı ve kontrol grubuna yakın bir görünüm sergilediği görülmüştür.
- Karaciğerdeki hücre proliferasyonunun gösterilmesi amacıyla değerlendirdiğimiz PCNA'nın pestisit verilen bütün gruplardaki düzeylerinin kontrol bireylerine göre artış gösterdiği saptanmıştır. Lupeol + pestisit uygulanmasının PCNA düzeylerini bütün gruplarda azalttığı tespit edilmiştir.
- Organofosforlu pestisit toksisitesinin en önemli göstergesi olan AChE enzim aktivitelerinin, pestisit verilen bütün gruplarda hem karaciğer dokusunda hem de serumda azaldığı gösterilmiştir. Lupeol + pestisit verilen bütün gruplarda ise AChE aktivitelerinde artış olduğu saptanmıştır.
- Pestisitler, TNF- α seviyelerinde artış meydana getirmiştir. Lupeol + pestisit gruplarında TNF- α düzeylerinin azaldığı saptanmıştır.

- Pestisit gruplarında ROT düzeylerinde artış meydana gelmektedir. Lupeol + pestisit gruplarında azalan ROT değerleri ise lupeolün yetersiz kalan antioksidan sisteme yardım ederek ROT süpürülmesinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir.
- Oksidatif hasarın en önemli göstergelerinden olan MDA seviyeleri pestisit verilen bütün gruplarda karaciğer dokusunda önemli ölçüde artmıştır. Lupeol + pestisit verilen gruplarda MDA seviyelerinde azalma görülmüştür.
- Pestisit verilen bütün gruplarda karaciğer dokusunda antioksidan dengenin bozulduğu GSH, SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin negatif olarak etkilendiği görülmüştür. Lupeol + pestisit gruplarında bozulan antioksidan dengenin iyileştiği görülmektedir.
- Lupeol uygulanmasının karaciğerde pestisitlerin meydana getirdiği reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak oluşabilecek oksidatif hasar üstünde koruyucu ve/veya iyileştirici etkisi olduğunu söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

- Aboubakr H. M., Elzohairy E. A., Ali A. A., Rashed L. A., Elkady N. K., ve Soliman A. S., 2019, Therapeutic effects of N-acetylcysteine against malathion-induced hepatotoxicity. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 9(1), 34.
- Abraham S. ve Furth, E. E., 1994, Receiver operating characteristic analysis of glycogenated nuclei in liver biopsy specimens: quantitative evaluation of their relationship with diabetes and obesity. *Human pathology*, 25(10), 1063-1068.
- Aebi H., 1984, Catalase *in vitro*, *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Akash M. S. H., Rehman K. ve Liaqat A., 2018, Tumor necrosis factor-alpha: role in development of insulin resistance and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 105-110.
- Akbel E., Arslan-Acaroz D., Demirel H. H., Kucukkurt I. ve Ince, S., 2018, The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the protective role of resveratrol. *Toxicology Research*, 7(3), 503-512.
- Atherton K. M., Williams F. M., Egea González F. J., Glass R., Rushton S., Blain P. G., ve Mutch E., 2009, DNA damage in horticultural farmers: a pilot study showing an association with organophosphate pesticide exposure. *Biomarkers*, 14(7), 443-451.
- Avcı B., Bilge S. S., Arslan G., Alici Ö., Darakci Ö., Baratzada, T., Çiftçioğlu E., Yardan T., Bozkurt A., 2018, Protective effects of dietary omega-3 fatty acid supplementation on organophosphate poisoning. *Toxicology and Industrial Health*, 34(2), 69-82.
- Azmi M. A., Naqvi S. N. H., Azmi M. A., ve Aslam M., 2006, Effect of pesticide residues on health and different enzyme levels in the blood of farm workers from Gadap (rural area) Karachi—Pakistan. *Chemosphere*, 64(10), 1739-1744.
- Bernardes M. F. F., Pazin M., Pereira L. C., ve Dorta D. J., 2015, Impact of pesticides on environmental and human health. *Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment (Andreazza C y Scola G Eds.)*. InTech, Croacia, vol 195-233.
- Betteridge, D. J., 2000, What is oxidative stress ?, *Metabolism*, 49(2), 3-8.
- Beutler E., 1975, *Glutathione in Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*, 2nd Ed. New York, Grune and Stratton, 112-114.
- Bingül İ., Başaran-Küçükgergin C., Tekkeşin M. S., Olgaç V., Doğru-Abbasoğlu S. ve Uysal M., 2013, Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 529-538.
- Blair A., Ritz B., Wesseling C., ve Freeman, L. B., 2015, Pesticides and human health, 72:81–82.

- Cabello G., Valenzuela M., Vilaxa A., Durán V., Rudolph I., Hrepic N. ve Calaf, G., 2001, A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition. *Environmental health perspectives*, 109(5), 471-479.
- Carvalho, F. P., 2017, Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60
- Chen W. Q., Yuan L., Xue R., Li Y. F., Su R. B., Zhang Y. Z. ve Li, J., 2011, Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology*, 32(4), 355-361.
- Circu M. L. ve Aw T. Y., 2012, Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(10), 1767-1777.
- Claeys W. L., Schmit J. F., Bragard C., Maghuin-Rogister G., Pussemier L., ve Schiffrers B., 2011, Exposure of several Belgian consumer groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food control*, 22(3-4), 508-516.
- Costa L. G., 2017, Organophosphorus compounds at 80: some old and new issues. *Toxicological Sciences*, 162(1), 24-35.
- Çayakar A., 2018, Nedir Bu Tümör Nekrozis Faktör Alfa?, *Türkiye Klinikleri J Intern Med*. 2018;3(2):67-76.
- Çobanoğlu H., Coşkun M. ve Çayır, A., 2020, Different working conditions shift the genetic damage levels of pesticide-exposed agriculture workers. *Environmental Science and Pollution Research International*.
- Denis Hamilton ve Stephen Crossley, 2004, Pesticide Residues in Food and Drinking Water Human Exposure and Risks John Wiley Sons Ltd, The Atrium.
- Devasagayam T. P. A., Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., ve Lele R. D., 2004, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804), 4.
- Dhouib I. E. B., Lasram M. M., Annabi A., Gharbi N.ve El-Fazaa S., 2015, A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat liver and spleen. *Pesticide biochemistry and physiology*, 124, 21-28.
- Dudley, N., Attwood, S. J., Goulson, D., Jarvis, D., Bharucha, Z. P., & Pretty, J., 2017, How should conservationists respond to pesticides as a driver of biodiversity loss in agroecosystems? , *Biological Conservation*, 209, 449-453.
- Duncan A., W. Dorrell, C., ve Grompe, M., 2009, Stem cells and liver regeneration., *Gastroenterology*, 137(2), 466-481.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., Canhilal, R., 2010, Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı 2:589-607.

- Eaton D. L., Daroff R. B., Autrup H., Bridges J., Buffler P., Costa L. G., Coyle J., McKhann G., Mobley W., Nadel L., Hermann R., Spencer P., ve Neubert, D., 2008, Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology*, 38(sup2), 1-125.
- Edwards D., 2006, "Reregistration Eligibility Decision for Malathion" *US Environmental Protection Agency - Prevention, Pesticides and Toxic Substances EPA 738-R-06-030 journal*, s. 9.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherstone R.M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine esterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Elzoghby R. R., Ahlam F. H., Abdel-Fatah A. ve Farouk, M., 2014, Protective role of vitamin C and green tea extract on malathion-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 9(3), 177.
- Ezzi L., Salah I. B., Haouas Z., Sakly A., Grissa I., Chakroun S. Kerkeni E., Hassine M., Mehdi M. ve Cheikh, H. B., 2016, Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4859-4867.
- Fang Y. Z., Yang S. ve Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
- Fernández A., Alvarez A., García M. D. ve Sáenz, M. T., 2001, Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. *Il Farmaco*, 56(4), 335-338.
- Flehi-Slim I., Boughattas S., Belaïd-Nouira Y., Sakly A., Neffati F., Najjar, M. F., Haouas Z. ve Ben Cheikh, H., 2016, Toxicological Effects of 30-Day Intake of Malathion on the Male Reproductive System of Wistar Rats. *Journal of food quality and hazards control*, 3(4), 152-156.
- Fortunato J. J., Feier G., Vitali A. M., Petronilho F. C., Dal-Pizzol F., ve Quevedo J., 2006, Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochemical Research*, 31(5), 671-678.
- Gallo M. B.ve Sarachine M. J., 2009, Biological activities of lupeol. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci*, 3(1), 46-66.
- García-García C. R., Parrón T., Requena M., Alarcón R., Tsatsakis A. M. ve Hernández A. F., 2016, Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life sciences*, 145, 274-283.
- Geetha T., ve Varalakshmi P., 2001, Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 76(1), 77-80.
- Gęgotek, A., ve Skrzydlewska, E., 2019, Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and physics of lipids*.

- Gevao B., Semple K. T., ve Jones K. C., 2000, Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental pollution*, 108(1), 3-14.
- Giri S., Prasad S. B., Giri A., ve Sharma G. D., 2002, Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1-2), 223-231.
- Goel A., Dani V. ve Dhawan D. K., 2005, Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chemico-biological interactions*, 156(2-3), 131-140.
- Grewal A. S., Grewal A. S., Singla A., Kamboj P. ve Dua, J. S., 2017, Pesticide residues in food grains, vegetables and fruits: a hazard to human health. *Journal of Medicinal Chemistry and Toxicology*, 2(1), 40-46.
- Gulec S. A., Szejnberg M. L., Siegel J. A., Jevremovic T. Ve Stabin M., 2010, Hepatic structural dosimetry in 90Y microsphere treatment: a Monte Carlo modeling approach based on lobular microanatomy. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(2), 301-310.
- Gupta R., Sharma A. K., Sharma M. C., Dobhal, M. P., ve Gupta R. S., 2012, Evaluation of antidiabetic and antioxidant potential of lupeol in experimental hyperglycaemia. *Natural product research*, 26(12), 1125-1129.
- Gupta V. K., Siddiqi N. J., Ojha A. K. ve Sharma B., 2019, Hepatoprotective effect of Aloe vera against cartap-and malathion-induced toxicity in Wistar rats. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 18329-18343.
- Halliwell B ve Whiteman M., 2004, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Halliwell B., Gutteridge J. M.C., 2015, Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA, 978-0-19-871747-8.
- Harada T., Takeda M., Kojima S.ve Tomiyama N., 2016, Toxicity and carcinogenicity of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicological research*, 32(1), 21-33.
- Hayden K. M., Norton M. C., Darcey D., Østbye T., Zandi P. P., Breitner J. C., ve Welsh-Bohmer K. A., 2010, Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology*, 74(19), 1524-1530.
- Hernández A. F., Parrón T. ve Alarcón R., 2011, Pesticides and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(2), 90-96.
- Jacobsen-Pereira C. H., dos Santos C. R., Maraslis F. T., Pimentel L., Feijó A. J. L., Silva C. I., de Medeiros G. S., Zeferino R.C., Pedrosa R. C., Maluf S. W., 2018, Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 177-183.

- John S., Kale M., Rathore N. ve Bhatnagar D., 2001, Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 12(9), 500-504.
- Jokanović M., 2018, Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. *Toxicology*, 410, 125-131.
- Kalender S., Uzun F. G., Durak D., Demir F. ve Kalender Y., 2010, Malathion-induced hepatotoxicity in rats: the effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 633-638.
- Kanel G. C., 2007, Histopathology of drug-induced liver disease. *Drug induced liver disease*, 237-89.
- Karabulut H. ve Gülay M. Ş., 2016, Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.
- Karami-Mohajeri S., Ahmadipour A., Rahimi H. R. ve Abdollahi M., 2017, Adverse effects of organophosphorus pesticides on the liver: a brief summary of four decades of research. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 68(4), 261-275.
- Kelman Z., 1997, PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629-640.
- Khadairi M. M., Hussein A. O. ve Al-Amari M. J. Y., 2018, Study of protective effect of vitamin C in reduction toxicity of malathion in white albino mice. *Plant Archives*, 18(1), 469-475.
- Khan S. M., Sobti R. C. ve Kataria L., 2005, Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta*, 358(1-2), 131-138.
- Kierszenbaum A. L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme, Ankara, ISBN:9944-341-02-9
- Kim K. H., Kabir E. ve Jahan S. A., 2017, Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535.
- Knebel C., Buhrke T., Süßmuth R., Lampen A., Marx-Stoelting P. ve Braeuning, A., 2019, Pregnane X receptor mediates steatotic effects of propiconazole and tebuconazole in human liver cell lines. *Archives of toxicology*, 93(5), 1311-1322.
- Kumari A. ve Kakkar P., 2012, Lupeol prevents acetaminophen-induced in vivo hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life sciences*, 90(15-16), 561-570.
- Laher, I., 2014, *Systems biology of free radicals and antioxidants*, Springer, 978-3-642-30019-6.
- Ledwozyw A., Michalak J., Stepień A., Kadziolka A., 1986, The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis, *Clinica Chimica Acta*, 155, 275-283.

- Lee G. H., ve Choi K. C., 2020, Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 108789.
- Li K., Zhu X., Wang, Y., Zheng S., ve Dong G., 2017, Effect of aerobic exercise intervention on DDT degradation and oxidative stress in rats. *Saudi journal of biological sciences*, 24(3), 664-671.
- Li S., Jiang Y., Sun Q., Coffin S., Chen L., Qiao K., Gui W. ve Zhu G., 2020, Tebuconazole induced oxidative stress related hepatotoxicity in adult and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 241, 125129.
- Li S., Tan H. Y., Wang N., Zhang Z. J., Lao L., Wong C. W. ve Feng Y., 2015, The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26087-26124.
- Li W. ve Xiao, Y., 2018, Synthesis and in vitro antitumour activities of lupeol derivatives. *Natural product research*, 32(1), 48-53.
- Lionetto M. G., Caricato R., Calisi A., Giordano M. E. Ve Schettino T., 2013, Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013.
- Liu Y., Bi T., Wang G., Dai W., Wu G., Qian L., Gao Q. ve Shen, G., 2015, Lupeol inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic cancer PCNA-1 cells through AKT/ERK pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 388(3), 295-304.
- López O., Hernández A. F., Rodrigo L., Gil F., Pena G., Serrano J. L. ve Pla, A., 2007, Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology letters*, 171(3), 146-153.
- Lorenz S., Rasmussen J. J., Süß A., Kalettka T., Golla B., Horney P., ve Schäfer R. B., 2017, Specifics and challenges of assessing exposure and effects of pesticides in small water bodies. *Hydrobiologia*, 793(1), 213-224.
- Lorke D. E., ve Petroianu G. A., 2019, Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *Journal of Applied Toxicology*, 39(1), 101-116.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr, A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lukaszewicz-Hussain A., 2010, Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pesticide biochemistry and physiology*, 98(2), 145-150.
- Ma P., Wu Y., Zeng Q., Gan Y., Chen J., Ye X., ve Yang X., 2013, Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and chemical toxicology*, 58, 177-183.

- Ma S., Yang J., Li J. ve Song, J., 2016, The clinical utility of the proliferating cell nuclear antigen expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 37(6), 7405-7412.
- Mahmoud S. M., Moneim A. E. A., Qayed M. M., ve El-Yamany N. A., 2019, Potential role of N-acetylcysteine on chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(20), 20731-20741.
- Maksymiv, I., 2015, Pesticides: benefits and hazards. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, 2(1), 70-76.
- Mansour S. A., ve Mossa A. T. H., 2010, Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(1), 14-23.
- Mansour S. A., Heikal T. M., Refaie A. A. ve Mossa A. H., 2011, Antihepatotoxic activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil against chlorpyrifos-induced liver injury in rats. *Glob J Environ Sci Technol*, 1(10).
- Marnett, L. J., 1999, Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 83-95.
- Mcafee A., 2017, A Brief History of Pesticide, *American Bee Journal*, 157(7):781-783.
- Meftaul I. M., Venkateswarlu K., Dharmarajan R., Annamalai P. ve Megharaj M., 2020, Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of The Total Environment*, 711, 134612.
- Mehta A., Verma R. S. ve Srivastava N., 2009, Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide biochemistry and physiology*, 94(2-3), 55-59.
- Mescher A. L., Junqueira L.C.U., 2018, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw Hill Medical Books, United States, 978-1-26-002618-4.
- Miraglia M., Marvin H. J. P., Kleter G. A., Battilani P., Brera C., Coni E., Cubadda F., Croci L., De Santis S., Dekkers S., Filipi L., Hutjes R.W.A., Noordam M.Y., Pisante M., Piva G., Prandi A., Toti L., Born van den G.J., ve Vesperman A., 2009, Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and chemical toxicology*, 47(5), 1009-1021.
- Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS., 2008, Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology*, 38(sup2), 1-125.
- Mostafalou S., Abdollahi M., Eghbal M. A. ve Kouzehkonani, N. S., 2012, Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2(1), 79.

- Mostafalou S., ve Abdollahi M., 2013, Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), 157-177.
- Mostafalou S., ve Abdollahi M., 2018, The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. *Toxicology*, 409, 44-52.
- Muskhelishvili L., Latendresse J. R., Kodell R. L. ve Henderson E. B., 2003, Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Histone mRNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(12), 1681–1688
- Mylroie A.A., Colins H., Umbles C., Kyle J., 1986, Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82, 512–520.
- Nagaraj M., Sunitha S. ve Varalakshmi, P., 2000, Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on the lipid peroxidation and antioxidant status in rat kidney after chronic cadmium exposure. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 20(5), 413-417.
- Navaei-Nigjeh M., Gholami M., Fakhri-Bafghi M. S., Baeeri M. ve Abdollahi, M., 2018, Molecular and biochemical evidences for beneficial effects of zinc oxide nanoparticles in modulation of chlorpyrifos toxicity in human lymphocytes. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 17(3), 927.
- Nigam N., Prasad S., George J. ve Shukla Y., 2009, Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin. *Biochemical and biophysical research communications*, 381(2), 253-258.
- Noworyta-Glowacka J., Beresinska M., Bankowski R., Wiadrowska B., Siennicka J. ve Ludwicki J. K., 2014, Effect of chlorpyrifos on the profile of subpopulations immunocompetent cells B, T and NK in in vivo model. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(4).
- Olgun S. ve Misra H. P., 2006, Pesticides induced oxidative stress in thymocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 290(1-2), 137.
- Othmène Y. B., Hamdi H., Annabi E., Amara I., Salem I. B., Neffati F., Najjar M.F. ve Abid-Essefi S., 2020, Tebuconazole induced cardiotoxicity in male adult rat. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111134.
- Özkara A., Akyıl D., ve Konuk, M., 2016, Pesticides, environmental pollution, and health. In *Environmental Health Risk-Hazardous Factors to Living Species*. IntechOpen.
- Pan L., Sun J., Li Z., Zhan Y., Xu S., ve Zhu L., 2018, Organophosphate pesticide in agricultural soils from the Yangtze River Delta of China: concentration, distribution, and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 4-11.

- Pariona A., "The Environmental Impact of Pesticides." *WorldAtlas*, Apr. 25, 2017, worldatlas.com/articles/what-is-the-environmental-impact-of-pesticides.html. [Ziyaret tarihi: 7 Ekim 2019].
- Piñeiro-Carrero V.M. ve Piñeiro Eric O., 2014, Liver, *Pediatrics*, 113 (3) 1097-1106.
- Pisoschi, A. M. ve Pop, A., 2015, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Prasad S., Kalra N., ve Shukla, Y., 2007, Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice., *Molecular nutrition & food research*, 51(3), 352-359.
- Prasad S., Kalra N., Singh M., Shukla Y., 2008, Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Asian journal of andrology*, 10(2), 313-318.
- Prasad S., Nigam N., Kalra N. ve Shukla Y., 2008, Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 47(12), 916-924.
- Preetha S. P., Kanniappan M., Selvakumar E., Nagaraj M., ve Varalakshmi P., 2006, Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 333-339.
- Ramana, K. V., Srivastava, S., ve Singhal, S. S., 2013, Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Remor A. P., Totti C. C., Moreira D. A., Dutra G. P., Heuser V. D., ve Boeira J. M., 2009, Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environment international*, 35(2), 273-278.
- Ramu R., Shirahatti P. S., Nanjunda Swamy S., Zameer F., Dhananjaya B. L. ve Prasad N., 2016, Assessment of in vivo antidiabetic properties of umbelliferone and lupeol constituents of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud Rasa Bale) flower in hyperglycaemic rodent model. *PLoS One*, 11(3).
- Ranjbar A. K. R. A. M., Pasalar P. ve Abdollahi M., 2002, Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Human & experimental toxicology*, 21(4), 179-182.
- Reynoso E. C., Torres E., Bettazzi F., ve Palchetti, I., 2019, Trends and perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors*, 9(1), 20.
- Rohlman D. S., Ismail A., Bonner M. R., Rasoul G. A., Hendy O., Dickey L. O., Wang K., Olson, J. R., 2019, Occupational pesticide exposure and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adolescent pesticide applicators in Egypt. *NeuroToxicology*, 74, 1-6.

- Saad H. B., Feki A., Boudawara O., Hakim A. ve Amara, I. B., 2017, Effects of selenium on tebuconazole-induced hepatotoxicity in adult rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 105-109.
- Saggu S., Sakeran M. I., Zidan N., Tousson E., Mohan A. ve Rehman, H., 2014, Ameliorating effect of chicory (*Chichorium intybus* L.) fruit extract against 4-tert-octylphenol induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food and chemical toxicology*, 72, 138-146.
- Saleem M., Maddodi N., Zaid M. A., Khan N., Hafeez B., Asim M., Suh Y., Yun J., Setaluri V., Mukhtar H., 2008, Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. *Clinical cancer research*, 14(7), 2119-2127.
- Saleem, M., 2009, Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene., *Cancer letters*, 285(2), 109-115.
- Serrano-Medina A., Ugalde-Lizárraga A., Bojorquez-Cuevas M. S., Garnica-Ruiz J., González-Corral M. A., García-Ledezma A., Pineda-García G., Cornejo-Bravo J. M., 2019, Neuropsychiatric Disorders in Farmers Associated with Organophosphorus Pesticide Exposure in a Rural Village of Northwest México. *International journal of environmental research and public health*, 16(5), 689.
- Seth V., Banerjee B. D., Ahmed R. S., Bhattacharya A. ve Pasha, S. T., 2008, Alterations in immunoglobulins and cytokine levels in blood of malathion poisoning cases.
- Severcan Ç., 2016, Malationun, rat karaciğer dokularında oksidan ve antioksidan sistem, inflamatuvar belirteçler ve bazı metabolik biyomoleküller üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Sharma A., Kumar V., Shahzad B., Tanveer M., Sidhu G. P. S., Handa N. ve Dar O. I., 2019, Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1446.
- Sharma S., Singh P., Chadha P. ve Saini H. S., 2019, Toxicity assessment of chlorpyrifos on different organs of rat: exploitation of microbial-based enzymatic system for neutralization. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(29), 29649-29659.
- Sheen-Chen S., Ho H., Chen W. ve Eng H., 2003, Obstructive Jaundice Alters Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Rat Small Intestine, *World Journal of Surgery*, 27, 1161-1164.
- Shen X., Cui X., Cui H., Jin Y., Jin W. ve Sun H., 2019, Geraniol and lupeol inhibit growth and promote apoptosis in human hepatocarcinoma cells through the MAPK signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), 5033-5041.
- Shivakumar A. ve Yogendra Kumar M. S., 2018, Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Critical reviews in analytical chemistry*, 48(3), 214-236.

- Shokrzadeh M., Shobi S., Attar H., Shayegan S., Payam S. S. ve Ghorbani F., 2012, Effect of vitamins A, E and C on liver enzyme activity in rats exposed to organophosphate pesticide diazinon. *Pak J Biol Sci*, 15(19), 936-941.
- Silva V., Mol H. G., Zomer P., Tienstra M., Ritsema C. J. ve Geissen, V., 2019, Pesticide residues in European agricultural soils–A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*, 653, 1532-1545.
- Sudhahar V., Kumar S. A., Mythili Y. ve Varalakshmi P., 2007, Remedial effect of lupeol and its ester derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stresses. *Nutrition Research*, 27(12), 778-787.
- Sunitha S., Nagaraj M. ve Varalakshmi P., 2001, Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*, 72(5), 516-523.
- Szpyrka E., Kurdziel A., Matyaszek A., Podbielska M., Rupar J., ve Słowik-Borowiec, M., 2015, Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from the region of south-eastern Poland. *Food Control*, 48, 137-142.
- Taghavian F., Vaezi G., Abdollahi M. ve Malekiran A. A., 2016, Comparative toxicological study between exposed and non-exposed farmers to organophosphorus pesticides. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(1), 89.
- Tang M., Zhao M., Shanshan Z., Chen K., Zhang C. ve Liu W., 2014, Assessing the underlying breast cancer risk of Chinese females contributed by dietary intake of residual DDT from agricultural soils. *Environment international*, 73, 208-215.
- Tanvir E. M., Afroz R., Chowdhury M. A. Z., Gan S. H., Karim N., Islam, M. N. ve Khalil, M. I., 2016, A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats. *Human & experimental toxicology*, 35(9), 991-1004.
- Taxvig C., Hass U., Axelstad M., Dalgaard M., Boberg J., Andeasen H. R., ve Vinggaard, A. M., 2007, Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sciences*, 100(2), 464-473.
- Tchimene M. K., Nwaehujor C. O., Ezenwali M., Okoli C. C. ve Iwu, M. M., 2016, Free radical scavenging activity of lupeol isolated from the methanol leaf extract of *Crateva adansonii* Oliv.(Capparidaceae). *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 8, 419-426.
- Tiryaki O., Canhilal R., ve Horuz S., 2010, Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri., *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(2), 154-169.
- Trefts E., Gannon M., ve Wasserman, D.H., 2017, The liver. *Current Biology*, 27, r1147-r1151.
- Tripathi S. ve Srivastav A. K., 2010, Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97(1), 60-65.
- Tsai F. S., Lin L. W. ve Wu C. R., 2016, Lupeol and its role in chronic diseases., In *Drug Discovery from Mother Nature* 929, 145-175.

- Uchendu C., Ambali S. F. ve Ayo, J. O., 2012, The organophosphate, chlorpyrifos, oxidative stress and the role of some antioxidants: a review. *African Journal of Agricultural Research* 7 (18), 2720-2728.
- Uchendu C., Ambali S. F., Ayo J. O. Ve Esievo, K. A., 2017, The protective role of alpha-lipoic acid on long-term exposure of rats to the combination of chlorpyrifos and deltamethrin pesticides. *Toxicology and industrial health*, 33(2), 159-170.
- Unsworth J., 2010, History of Pesticide Use, http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31, [Ziyaret Tarihi: 21 kasım 2019].
- Ventura C., Nieto M. R. R., Bourguignon N., Lux-Lantos V., Rodrigue, H., Cao G., Randi A., Cocca C. ve Núñez M., 2016, Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 156, 1-9.
- Wang N., Wang B., Wen J., Li X., Pan L., Zhang J. ve Zhu B., 2019, Types of exposure pesticide poisoning in Jiangsu Province, China; the epidemiologic trend between 2006 and 2018. *International journal of environmental research and public health*, 16(14), 2586.
- Wilson C., ve Tisdell C., 2001, Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological economics*, 39(3), 449-462.
- Wolf D.C., Allen J.W., George M.H., Hester S.D., Sun G., Moore T., Thai S-F., Delker D., Winkfield E., Leavitt S., Nelson G., Roop B.C., Jones C., Thibodeaux J., Nesnow S., 2006, Toxicity profiles in rats treated with tumorigenic and nontumorigenic triazole conazole fungicides: propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. *Toxicologic pathology*, 34(7), 895-902.
- Yadav S., Singh M., ve Yadav R., 2016, Organophosphates induced Alzheimer's disease: an epigenetic aspect. *J Clin Epigenet*, 2(1), 2472-1158.
- Yang J. D., Liu S. H., Liao M. H., Chen R. M., Liu P. Y. ve Ueng, T. H., 2018, Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental toxicology*, 33(8), 899-907.
- Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P., Bahadoran, Z., 2015, Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants., *Asian journal of sports medicine*, 6(1).
- Young B., Woodford P., O'Dowd G., 2013, *Wheater's functional histology : a text and colour atlas* 6nd ed., Elsevier Ltd. Churchill Livingstone, United States of America, ISBN: 978-0-7020-4747-3.
- Xu M. Y., Wang P., Sun Y. J., Yang L. ve Wu Y. J., 2017, Joint toxicity of chlorpyrifos and cadmium on the oxidative stress and mitochondrial damage in neuronal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 246-252.

Zaganas I., Kapetanaki S., Mastorodemos V., Kanavouras K., Colosio C., Wilks M. F., ve Tsatsakis A. M., 2013, Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence?, *Toxicology*, 307, 3-11.

Želonková K., Havadej S., Verebová V., Holečková B., Uličný J. ve Staničová, J., 2019, Fungicide Tebuconazole Influences the Structure of Human Serum Albumin Molecule. *Molecules*, 24(17), 3190.

Zhang Y., Chen J., Ji H., Xiao Z.G., Shen P. ve Xu L.H., 2018, Protective effects of danshen injection against erectile dysfunction via suppression of endoplasmic reticulum stress activation in a streptozotocin-induced diabetic rat model, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 18:343

http://zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=30892&tipi=5&sube=0 [Ziyaret tarihi: 26 Mart 2020].

<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/RP/visualize> [Ziyaret Tarihi: 24 Nisan 2020].

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Melis Çöremen
Doğum Yeri	Üsküdar / İstanbul
Doğum Tarihi	06.04.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05383012849
E-Posta Adresi	meliscoremen@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji Programı

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	