



Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

FARELERDE FİPRONİL İLE İNDÜKLENEN OKSİDATİF STRES, YANGI VE APOPTOZİSE KARŞI MALVİDİNİN KORUYUCU ETKİSİ

Simge GARLI

Danışman
Prof. Dr. Fatma KOCASARI

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE FİPRONİL İLE İNDÜKLENEN
OKSİDATİF STRES, YANGI VE APOPTOZİSE KARŞI
MALVİDİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Vet. Hek. Simge GARLI

DOKTORA TEZİ

VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Fatma KOCASARI

Bu Araştırma “*Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü*” tarafından “0846-DR-22” ve “TÜBİTAK 1002B Hızlı Destek Programı” kapsamında “123S360” proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2024

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren ve beni yüreklendiren, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Fatma KOCASARI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli bilgi, tecrübe ve destekleri için, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Asım KART hocama, doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmamın uygulama sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve çalışmamıza yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı değerli hocam Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca yanımda en büyük desteğim ve doktora eğitimim için bana yol gösterici olan annem Dr. Meltem DERELİ'ye, haklarını asla ödeyemeyeceğim kıymetli babam Tayfun DERELİ'ye, hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni güler yüzüyle neşelendiren kardeşime çok teşekkür ederim. Bu hayattaki en büyük mucizem, varlığıyla her anımı güzelleştiren, lisans ve doktora dönemlerimde bana hep destek olan, eşsiz sevgisiyle bana güç veren sevgili eşim Serkan GARLI'ya sonsuz teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
TÜRKÇE ÖZET	xiii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pestisidler	3
2.1.1. Fipronil (FPN)	3
2.1.1.1. Fipronilin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1.2. Fipronilin Etki Mekanizması	4
2.1.1.3. Fipronilin Toksisitesi	5
2.1.1.4. Fipronilin Oksidatif Stres, İnflamasyon ve Apoptozis Mekanizmaları Üzerindeki Etkileri	6
2.1.1.4.1. Fipronilin Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri	6
2.1.1.4.2. Fipronilin Yangı Üzerindeki Etkileri	11
2.1.1.4.3. Fipronilin Apoptozis Üzerindeki Etkileri	13
2.2. Antosiyaninler	17
2.2.1. Malvidin (MLV)	19
2.2.1.1. Malvidinin Kaynakları ve Kimyasal Yapısı	19
2.2.1.2. Malvidinin Farmakokinetiği	21
2.2.1.3. Malvidinin Antioksidan Etkileri	23
2.2.1.4. Malvidinin Antiinflatuar Etkileri	25
2.2.1.5. Malvidinin Antikanserojen Etkileri	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali	33
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	34
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Kan ve Doku Analizleri	35
3.2.2. Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularının Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması	35
3.2.3. Süperoksid Dismutaz (SOD) Analizi	36
3.2.4. Katalaz (CAT) Analizi	37
3.2.5. Glutasyon Peroksidaz 1 (GPx1) Analizi	39
3.2.6. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz 2 (iNOS2) Analizi	41
3.2.7. Siklooksijenaz 2 (COX-2) Analizi	42
3.2.8. Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) Analizi	43
3.2.6. Glutasyon (GSH) Analizi	45
3.2.7. Malondialdehid (MDA) Analizi	46
3.2.8. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlgili Faktör-2 (Nrf2) Analizi	48

3.2.9. Nükleer Faktör Kappa B2 (NF-κB2) Analizi	50
3.2.10. İnterlökin 1 β (IL-1β) Analizi	51
3.2.11. 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Analizi	53
3.2.12. Dokulardaki Total Protein Yoğunluğu	54
3.2.13. Histopatoloji Yöntemi	54
3.3.14. İmmunohistokimya Yöntemi	56
3.2.15. İstatistiksel Hesaplamalar	58
4. BULGULAR	59
4.1. Biyokimyasal Parametreler	59
4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri	61
4.3. Antiinflamatuvar-İnflamatuvar Parametreler ve Transkripsiyon Faktör Düzeyleri	66
4.4. Histopatolojik Bulgular	70
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	76
4.5.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları	76
4.5.2. Kaspaz-9 İmmunohistokimyasal Bulguları	82
4.5.3. Bcl-2 İmmunohistokimyasal Bulguları	87
4.5.4. Bax İmmunohistokimyasal Bulguları	92
5. TARTIŞMA	97
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	116
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	140

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Fipronilin kimyasal yapısı (Gupta ve Anadón, 2018)	3
Şekil 2.2.	Fipronilin etki mekanizması (Wang ve ark., 2016)	9
Şekil 2.3.	Apoptoz yolları (Jan, 2019)	15
Şekil 2.4.	Flavilyum katyonu ve antosiyaninlerin temel yapısı (Mazza, 2007)	18
Şekil 2.5.	Antosiyaninlerin doğal kaynakları (Tena ve ark., 2020)	19
Şekil 2.6.	Malvidinin kimyasal yapısı (Khoo ve ark., 2017)	20
Şekil 2.7.	Malvidinin doğal kaynakları (Zhang ve ark., 2019)	20
Şekil 2.8.	Malvidin ve glikozidlerinin antiinflamatuvar ve antioksidan mekanizmaları (Merecz-Sadowska ve ark., 2023)	28
Şekil 3.1.	Süperoksit dismutaz (SOD) standart grafiği	37
Şekil 3.2.	Katalaz (CAT) standart grafiği	39
Şekil 3.3.	Glutasyon peroksidaz 1 (GPx1) standart grafiği	40
Şekil 3.4.	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz 2 (iNOS2) standart grafiği	42
Şekil 3.5.	Siklooksijenaz 2 (COX-2) standart grafiği	43
Şekil 3.6.	Tümör nekroz faktör α (TNF- α) standart grafiği	44
Şekil 3.7.	Glutasyon (GSH) standart grafiği	46
Şekil 3.8.	Malondialdehid (MDA) standart grafiği	47
Şekil 3.9.	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilgili faktör 2 (Nrf2) standart grafiği	49
Şekil 3.10.	Nükleer faktör kappa B2 (NF- κ B2) standart grafiği	50
Şekil 3.11.	İnterlökin 1 β (IL-1 β) standart grafiği	52
Şekil 3.12.	8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) standart grafiği	53
Şekil 4.1.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer fonksiyonları üzerine etkileri	59
Şekil 4.2.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek fonksiyonları üzerine etkileri	60
Şekil 4.3.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularında antioksidan enzim etkinlikleri	61
Şekil 4.4.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularında oksidatif stres parametreleri	62
Şekil 4.5.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularında antioksidan enzim etkinlikleri	63
Şekil 4.6.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularında oksidatif stres parametreleri	64
Şekil 4.7.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularında antioksidan enzim etkinlikleri	65
Şekil 4.8.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularında oksidatif stres parametreleri	65
Şekil 4.9.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri	66
Şekil 4.10.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularındaki yangısal parametreler	67
Şekil 4.11.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri	68
Şekil 4.12.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularındaki yangısal parametreler	68

Şekil 4.13.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri	69
Şekil 4.14.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularındaki yangısal parametreler	69
Şekil 4.15.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünümüleri	72
Şekil 4.16.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünümüleri	73
Şekil 4.17.	Araştırma gruplarının beyin dokularına ait histopatolojik görünümüleri	74
Şekil 4.18.	Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait histopatolojik görünümüleri	75
Şekil 4.19.	Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait histopatolojik görünümüleri	76
Şekil 4.20.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	77
Şekil 4.21.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	78
Şekil 4.22.	Araştırma gruplarının beyin dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	79
Şekil 4.23.	Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	80
Şekil 4.24.	Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	81
Şekil 4.25.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	82
Şekil 4.26.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	83
Şekil 4.27.	Araştırma gruplarının beyin dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	84
Şekil 4.28.	Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	85
Şekil 4.29.	Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	86
Şekil 4.30.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	87
Şekil 4.31.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	88
Şekil 4.32.	Araştırma gruplarının beyin dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	89
Şekil 4.33.	Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	90
Şekil 4.34.	Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	91
Şekil 4.35.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	92
Şekil 4.36.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	93

Şekil 4.37.	Araştırma gruplarının beyin dokularına ait ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	Bax	105
Şekil 4.38.	Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	Bax	106
Şekil 4.39.	Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri	Bax	107



TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Türkiye’de kullanımına izin verilen fipronil (FPN) ve fipronil sülfon metabolitinin kabul edilebilir en yüksek kalıntı limitleri	4
Tablo 3.1.	Araştırmada kullanılan hayvan gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler (n:12)	33
Tablo 3.2.	Araştırmada kullanılan cihaz ve gereçler	34
Tablo 3.3.	Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler	35
Tablo 3.4.	Histopatolojik skorlama kriterleri	56
Tablo 4.1.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine etkileri	60
Tablo 4.2.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularında oksidatif stres parametreleri	62
Tablo 4.3.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularında oksidatif stres parametreleri	63
Tablo 4.4.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularında oksidatif stres parametreleri	64
Tablo 4.5.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer dokularındaki yangısal parametreler ve transkripsiyon faktör düzeyleri	66
Tablo 4.6.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) böbrek dokularındaki yangısal parametreler ve transkripsiyon faktör düzeyleri	67
Tablo 4.7.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) beyin dokularındaki yangısal parametreler ve transkripsiyon faktör düzeyleri	70
Tablo 4.8.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) karaciğer, böbrek, beyin, beyincik ve hipokampus dokularında histopatoloji skorlarının istatistiksel analizi	71
Tablo 4.9.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) dokulardaki kaspaz-3 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi	81
Tablo 4.10.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) dokulardaki kaspaz-9 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi	86
Tablo 4.11.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) dokulardaki Bcl-2 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi	91
Tablo 4.12.	Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+ FPN) dokulardaki Bax immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi	96

SİMGELER ve KISALTMALAR

8-OHDG	8-hidroksideoksiguanozin
Akt	Protein kinaz B
ALT	Alanin aminotransferaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ARE	Antioksidan yanıt elemanı
AST	Aspartat aminotransferaz
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücreli lenfoma
Bcl-xL	Bcl-2 ailesi üyesi
CaCo-2	İnsan epitelyal kolorektal adenokarsinom
CAD	Kaspazla aktiveleştirilen DNA
CAT	Katalaz
COX	Siklooksijenaz
CuSO₄	Bakır sülfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
GABA	Gama-aminobutirik asit
GLUT	Glikoz taşıyıcıları
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSPE	Üzüm çekirdeği prosiyanidin özütü
GST	Glutasyon transferaz
HE	Hematoksileneozin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HO-1	Hem oksijenaz-1
HOO⁻	Perhidroksi radikalleri
ICAM-1	Hücreler arası adhezyon molekülü-1
IKK	İkB kinazlar
İkBα	İnhibitör kappa B alfa
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
Keap1	Kelch benzeri ECH'ye bağlı protein-1
LOX	Lipooksijenaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
Malβg	Malvidin-3-O-β glukozitin
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDA	Malondialdehit
MMP	Matriks metaloproteinazlar
Mv3glc	Malvidin-3-glukozit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaCl	Sodyum klorür

NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NLR	NOD benzeri reseptörler
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilgili faktör 2
OA	Osteoartrit
OAT2	Organik anyon taşıyıcılar
OH	Hidroksil
O₂⁻	Süperoksit anyonları
ÖD₅₀	Öldürücü doz 50
PARP	Poli (ADP-riboz) polimera
PBMC	Periferal kan mononükleer hücreleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SGLT1	Sodyuma bağlı glukoz kotransporter
SMCT	Sodyum/monokarboksilat taşıyıcı
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürat asit reaktif maddeleri
TLR	Toll benzeri reseptörler
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa

ÖZET

Farelerde Fipronil ile İndüklenen Oksidatif Stres, Yangı ve Apoptozise Karşı Malvidinin Koruyucu Etkisi

Bu araştırmada farelerde fipronil ile indüklenen oksidatif stres, yangı ve apoptozise karşı malvidinin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı. Araştırmada toplam 48 adet CD-1 erkek fare kullanıldı. Kontrol, fipronil, malvidin ve malvidin+fipronilin birlikte verildiği grup olmak üzere toplam 4 grup (n:12) oluşturuldu. Kontrol grubuna 14 gün süreyle gavaj ile %0,1 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren %0,9'luk NaCl (5 mg/kg c.a) verildi. Fipronil grubuna 14 gün süreyle 5 mg/kg/c.a/gün gavajla fipronil, malvidin grubuna 14 gün süreyle 5 mg/kg/c.a/gün (% 0,9'luk fizyolojik NaCl içinde) gavajla malvidin hidroklorür uygulandı. Malvidin+fipronilin birlikte verildiği gruba ise malvidin hidroklorür (5 mg/kg/c.a/gün gavajla), fipronil (5 mg/kg/c.a/gün gavajla) uygulamasından 2 saat önce 14 gün süreyle verildi. Araştırma 15. günde sonlandırıldı ve farelerden kan, karaciğer, böbrek ve beyin örnekleri alındı. Serum örneklerinde *alanin aminotransferaz* (ALT) ve *aspartat aminotransferaz* (AST) enzim etkinlikleri ile kreatinin ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri analiz edildi. Karaciğer, böbrek ve beyin homojenatlarında *süperoksit dismutaz* (SOD), *katalaz* (CAT), *glutatyon peroksidaz* (GPx), *indüklenbilir nitrik oksit sentaz* (iNOS), *siklooksijenaz-2* (COX-2) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) etkinlikleri ile glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), nükleer faktör kapp B2 (NF- κ B2), nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2 (Nrf2), interlökin-1 β (IL-1 β) ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca karaciğer, böbrek ve beyin örneklerinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Fipronil verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT, kreatinin ve BUN değerlerinde önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$), malvidin+fipronilin birlikte verildiği grupta ise, fipronilin tek başına verildiğinde artan AST, ALT, kreatinin ve BUN değerlerinde önemli düzeyde bir düşüş ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Karaciğer, böbrek ve beyin doku homojenatlarında fipronil verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA, NF- κ B, 8-OHdG, TNF- α ve IL-1 β düzeyleri iNOS ve COX-2 aktivitelerinde önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$); SOD, CAT ve GPx enzimlerinin etkinliği ile GSH ve Nrf2 düzeylerinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edildi. Malvidin+fipronilin birlikte verildiği grupta ise, fipronilin tek başına verildiği gruba göre MDA, NF- κ B, 8-OHdG, TNF- α ve IL-1 β düzeyleri iNOS ve COX-2 aktivitelerinde önemli düzeyde önemli düzeyde bir düşüş ($p<0,05$); SOD, CAT ve GPx enzimlerinin etkinliği ile GSH ve Nrf2 düzeylerinde ise önemli düzeyde bir artış ($p<0,05$) belirlendi. Ayrıca fipronil uygulanan grupta, kontrol grubuna göre hayvanların hem karaciğer ve böbrek hem de beyin dokularında hayvanların dokularında histopatolojik değişiklikler ile kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax ekspresyonlarında önemli artış ($p<0,001$), Bcl-2 ekspresyonlarında ise önemli bir düşüş ($p<0,001$) tespit edildi. Malvidin+fipronilin birlikte verildiği grupta ise dokularda patolojik lezyonlarda belirgin bir azalma ile kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax ekspresyonlarında önemli düşüş ($p<0,001$), Bcl-2 ekspresyonlarında önemli artış ($p<0,001$) saptandı. Bu bulgulara bağlı olarak 5 mg/kg c.a dozunda uygulanan fipronilin karaciğer, böbrek ve beyin hasarına yol açtığı; malvidin uygulamasının ise oksidatif stresi, yangıyı, apoptozisi ve doku hasarı belirteçlerini, histopatolojik değişiklikleri azaltarak karaciğer, böbrek ve beyin üzerindeki toksisitesini önlediği tespit edildi. Sonuç olarak malvidinin fipronil ile indüklenen karaciğer, böbrek ve beyin hasarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptik koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Fipronil, Malvidin, Oksidatif Stres, Yangı

ABSTRACT

Protective Effect of Malvidin Against Fipronil-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Mice

The aim of this study was to investigate the protective activity of malvidine against fipronil-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. A total of 48 CD-1 male mice were used in the study. A total of 4 groups (n:12) were formed as control, FPN, MLV and MLV+ FPN groups. The control group received 0.9% NaCl (5 mg/kg c.a) containing 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) by gavage for 14 days. FPN group received FPN by gavage at 5 mg/kg/b.w./day for 14 days and MLV group received malvidin hydrochloride by gavage at 5 mg/kg/ b.w./day (in 0.9% NaCl) for 14 days. In the group in which MLV+ FPN was given together, malvidin hydrochloride (5 mg/kg/b.w/day by gavage) was given 2 hours before fipronil (5 mg/kg/b.w/day by gavage) for 14 days. The study was terminated on day 15 and blood, liver, kidney and brain samples were collected from the mice. Serum samples were analyzed for *alanine aminotransferase* (ALT) and *aspartate aminotransferase* (AST) enzyme activities, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) levels. *Superoxide dismutase* (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), inducible nitric oxide synthase (iNOS), *cyclooxygenase-2* (COX-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) activities and glutathione (GSH) levels were analyzed in liver, kidney and brain homogenates, malondialdehyde (MDA), nuclear factor kappa B2 (NF- κ B2), nuclear transcription factor erythroid-2-like factor 2 (Nrf2), interleukin-1 β (IL-1 β) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels were measured. Histopathologic and immunohistochemical examinations were also performed in liver, kidney and brain samples. There was a significant increase ($p<0.05$) in serum AST, ALT, creatinine and BUN values in the group given fipronil compared to the control group, and a significant decrease ($p<0.05$) in serum AST, ALT, creatinine and BUN values in the group given malvidin+fipronil together compared to the group given fipronil alone. In liver, kidney and brain tissue homogenates, there was a significant increase in MDA, NF- κ B, 8-OHdG, TNF- α and IL-1 β levels, iNOS and COX-2 activities in the fipronil-administered group compared to the control group; a significant decrease ($p<0.05$) was detected in the activity of SOD, CAT and GPx enzymes and in GSH and Nrf2 levels. In the group in which group given malvidin+fipronil was administered together, there was a significant decrease ($p<0.05$) in MDA, NF- κ B, 8-OHdG, TNF- α and IL-1 β levels, iNOS and COX-2 activities compared to the group where fipronil was given alone; a significant increase ($p<0.05$) was determined in the activity of SOD, CAT and GPx enzymes and in GSH and Nrf2 levels. In addition, in the fipronil treated group, a significant increase ($p<0.001$) in caspase-3, caspase-9 and Bax expressions and a significant decrease ($p<0.001$) in Bcl-2 expressions were detected in the histopathological changes in both liver, kidney and brain tissues of the animals compared to the control group. In the group given malvidin+fipronil together was administered together, there was a significant decrease in pathological lesions in the tissues, a significant decrease in caspase-3, caspase-9 and Bax expressions ($p<0.001$) and a significant increase in Bcl-2 expressions ($p<0.001$). Based on these findings, it was determined that fipronil administered at a dose of 5 mg/kg c.a caused liver, kidney and brain damage, while malvidin administration prevented its toxicity on liver, kidney and brain by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, tissue damage markers and histopathological changes. In conclusion, it was concluded that malvidin can be used as an antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic protective agent against fipronil induced liver, kidney and brain damage.

Keywords: Apoptosis, Fipronil, Malvidin, Oxidative stress, Inflammation

1. GİRİŞ

Pestisidler insan, hayvan, bitki ve cansız yüzeylerde bulunan veya yaşayan pest (haşerat) adı verilen zararlılarla (böcekler, kemirgenler, mantarlar ve istenmeyen zararlı otlar) mücadele kapsamında kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Pestisidler, kimyasal yapıları dolayısıyla tüm canlılar için potansiyel olarak zehirlidir ve güvenli şekilde kullanılmaları gerekmektedir (Kaya, 2014). Pestisit kullanımında birçok haşerat, piyasadaki organofosfatlara, karbamatlara ve piretroidlere karşı direnç geliştirmiştir (Alyokhin ve ark., 2008). Mevcut insektisitlerle yapılan mücadelede artan dirence karşı fipronil hem tarımsal hem de kentsel ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Bobe ve ark., 1997). Çevrede fipronil, sırasıyla fipronil sülfid, fipronil sülfon, fipronil amid veya fipronil desülfidli oluşturmak üzere indirgeme, oksidasyon, hidroliz veya fotolize uğrayabilir. Fipronil amid dışındaki bu metabolitlerin ana bileşiğe göre daha fazla veya daha az toksik ve kalıcı olduğu rapor edilmiştir (Hainzl ve ark., 1996; Qu ve ark., 2016b; Tingle ve ark., 2003; Weston ve Lydy, 2013).

Dünya çapında fipronil pirinç, pamuk, sorgum, mısır, tahıl taneleri (arpa, yulaf, çavdar, tritikale ve buğday), mera otu, saman gibi ürünlerde haşerelere karşı kullanılır. Ayrıca fipronil hamamböceği, sivrisinek, çekirge, termit, kök kurdu, kene ve pire gibi geniş böcek yelpazesinin hem larva hem de ergin aşamalarına etki gösterir (Gunasekara ve ark., 2007; Tingle ve ark., 2003). Dünyada yaygın ve sık kullanımının ardından fipronilin istenmeyen etkileri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Hayasaka ve ark., 2012a; Hayasaka ve ark., 2012b; Liu ve ark., 2012). Fipronil suda yaşayan çeşitli organizmalar için yüksek toksisite gösterir (Taillebois ve ark., 2015). Laboratuvar kemirgenlerinde akut fipronil toksisitesi (>50 mg/kg vücut ağırlığı), titreme, değişen aktivite veya yürüyüş, kambur duruş, ajitasyon, nöbetler ve ölüm ile karakterize edilmiş ve dozlamadan yedi saat sonra sinir sistemi işlevindeki değişiklikler kaydedilmiştir (Fung ve ark., 2003; Mohamed ve ark., 2004). İnsanlarda kazara fipronil zehirlenmesi vakaları da rapor edilmiştir ve fipronil zehirlenmesi kusma, ajitasyon ve nöbetlerle karakterize edilmiştir (Mohamed ve ark., 2004).

Son yıllarda, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere çoğu ülkede çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak yerel doğal ürünlerin kullanılma oranlarında önemli artışlar grlmştr. Doğal ürünlere talebin artması sebebiyle ürünlerde bulunan aktif maddeler araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Antika ve Dewi, 2020; Fang, 2014). Özellikle doğal ürünlerdeki çeşitli biyoaktif bileşiklerin canlılar üzerinde çok yönlü etkileri vardır. Bu biyoaktif bileşiklerin en önemlileri arasında polifenolik yapıda bulunan maddeler yer alır. Polifenolik bileşiklerin önemli üyelerinden biri flavonoidlerdir. Antosiyaninler, flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir ve flavilyum katyonları oluşturma kapasiteleri nedeniyle diğer flavonoidlerden ayrılırlar (Harborne, 1998). Antosiyaninlerin önemli bir yesi olan malvidinin antioksidan, yangı ve kanser nleme ile nöroprotektif etkileri başta olmak üzere birçok farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda malvidin araştırmacılar tarafından ilgi odağı haline gelmiş antosiyaninlerden biridir. Malvidin kimyasal yapısı dolayısıyla güçlü antioksidan aktivitesinin bulunması ve suda çözünmesi sonucu biyoyararlanımının yüksek olması sebebiyle oksidatif strese ve sonucunda şekillenen bozukluklara karşı koruyucu olarak tercih edilen bir bileşiktir (Decendit ve ark., 2013; Fagundes ve ark., 2021).

Bu çalışmada, farelerde fipronil ile oluşturulan karaciğer, böbrek ve beyin hasarına karşı malvidinin koruyucu etkisi araştırılarak kullanılabilirliğinin ortaya konması ve literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

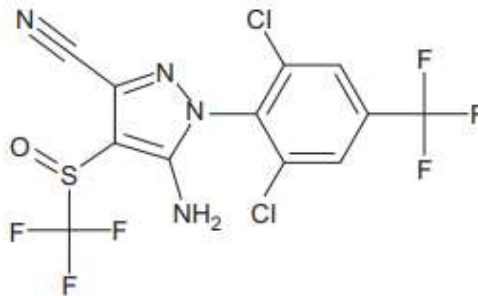
2.1. Pestisidler

Pestisidler insan, hayvan, bitki ve cansız yüzeylerde bulunan veya yaşayan pest (haşerat) adı verilen zararlılarla (böcekler, kemirgenler, mantarlar ve istenmeyen zararlı otlar) mücadele kapsamında kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Pestisidler tüm canlılar için potansiyel olarak zehirlidir ve dolayısıyla güvenli şekilde kullanılmaları gerekmektedir (Kaya, 2014). Pestisid kullanımında birçok haşerat, piyasadaki organofosfatlara, karbamatlara ve piretroidlere karşı direnç geliştirmiştir (Alyokhin ve ark., 2008). Mevcut insektisidlerle yapılan mücadelede artan dirence karşı fipronil hem tarımsal hem de kentsel ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta ve Anadón, 2018).

2.1.1. Fipronil

2.1.1.1. Fipronilin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Fipronil, fenilpirazoller adı verilen yeni bir böcek ilacı sınıfının üyesidir. Kimyasal adı 5-amino-1-[2,6-dikloro-4-(triflorometil)fenil]-4-[(triflorometil)sülfinil]-1H-pirazol olan fipronil, triflorometilsülfonil yapısına sahip N-fenilpirazol türevi bir insektisittir (Gupta ve Anadón, 2018) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Fipronilin kimyasal yapısı (Gupta ve Anadón, 2018).

Çevrede fipronil, sırasıyla fipronil sülfid, fipronil sülfon, fipronil amid veya fipronil desülfidini oluşturmak üzere indirgeme, oksidasyon, hidroliz veya fotolize uğrayabilir. Fipronil amid dışındaki bu metabolitlerin ana bileşiğe göre daha fazla veya daha az toksik ve kalıcı olduğu rapor edilmiştir (Hainzl ve Casida, 1996; Qu ve ark., 2016b; Tingle ve ark., 2003; Weston ve Lydy, 2013). Dünya çapında fipronil pirinç, pamuk, sorgum, ayçiçeği, mısır, tahıl taneleri (arpa, yulaf, çavdar, tritikale ve buğday), mera otu, saman gibi ürünlerde haşerelere karşı kullanılır (Gunasekara ve ark., 2007; Tingle ve ark., 2003). Türkiye’de kullanımına izin verilen fipronil ile ilgili değerler Tablo 2.1’de verilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2008).

Tablo 2.1. Türkiye’de kullanımına izin verilen fipronil ve fipronil sülfon metabolitinin kabul edilebilir en yüksek kalıntı limitleri (Türk Gıda Kodeksi, 2008).

Gıda maddesi	Maksimum limit (µg/kg)
Ayçiçeği tohumu	0,005*
Mısır	0,005*

Fipronil hamamböceği, sivrisinek, çekirge, termitler, kök kurdu, keneler ve pire gibi geniş böcek yelpazesinin hem larva hem de ergin aşamalarına etki gösterir (Gunasekara ve ark., 2007). Özellikle fipronil, kedi ve köpeklerde *Ctenocephalides* (*C. canis* ve *C. felis*) soyundaki pireler ve *Ixodes* (*I. ricinus*) ve *Rhipicephalus* (*R. sanguineus*) soyundaki keneler ile sığırlarda *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* kenelerine karşı veteriner ilacı olarak da kullanılmaktadır (Beugnet ve ark., 2015; Bonneau ve ark., 2015; Castro Janer ve ark. 2015). Fipronil içeren çeşitli ticari ürünlerin, konutlarda böcek kontrolü, pirinç ve pamuk üretimi ile çimlendirme dahil olmak üzere haşerelere karşı uygulanması dünya çapında popülerlik kazanmıştır (Beugnet ve ark., 2015).

2.1.1.2. Fipronilin Etki Mekanizması

Fipronil, Gama-aminobutirik asit (GABA) kanalları üzerine etki gösterir (GABAA reseptör antagonistidir) ve GABA-klorür kanalını hedefleyerek normal nöronal akışı bozar. (Gunasekara ve ark., 2007). Hücre zarında GABA-GABAA-bağlı

klor kanallarını etkiler; kanalların açılmasını etkileyerek hücreye klor girişini önler. Böylece hücre içi ve hücre dışı arasındaki gerilim farkı azalır; hücre kolay uyarılabilir hale gelir. Bu etki sonucu şiddetli uyarılar şekillenir. GABA-klorür kanalları hem omurgalıların hem de omurgasızların merkezi sinir sisteminde eksprese edilmesine rağmen fipronil, omurgalı GABAA reseptörlerine göre böcek GABA reseptörleri için oldukça yüksek bir afiniteye ve omurgalı GABAC reseptörleri için çok az afiniteye sahiptir (Stehr ve ark., 2006). Memelilerde GABA tarafından düzenlenen klorür kanalları için daha düşük bağlanma afinitesi, böcekler için seçiciliği ve güvenlik aralığını artırır (Badgujar ve ark., 2015). Ayrıca, glutamatla aktive olan klorür kanalları da fipronilin hedefi konumundadır (Narahashi ve ark., 2010). GABA reseptörlerine ek olarak, fipronil omurgasızlar üzerinde omurgalılardan daha etkilidir çünkü glutamatla aktive olan klorür kanalları böcekler gibi omurgasızlarda bulunur (Simon-Delso ve ark., 2015). Ayrıca glisin reseptörlerinin fipronil için omurgalılarda toksisite hedefleri olabileceği bildirilmektedir. Glisin reseptörü, iyonotropik bir reseptördür ve etkilerini klorür akımı yoluyla üretir. Merkezi sinir sisteminde en yaygın olarak bulunan inhibitör reseptörlerden biri olan glisin reseptörleri, omurilik ve beyin sapında inhibitör nörotransmisyona aracılık etmede kritik roller oynar (Lynch, 2004).

2.1.1.3. Fipronilin Toksisitesi

Dünyada yaygın ve sık kullanımın ardından fipronilin istenmeyen etkileri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Hayasaka ve ark., 2012a, Hayasaka ve ark., 2012b; Liu ve ark., 2012). Fipronil suda yaşayan çeşitli organizmalar için yüksek toksisite gösterir (Taillebois ve ark., 2015). Laboratuvar kemirgenlerinde akut fipronil toksisitesi (>50 mg/kg vücut ağırlığı), titreme, değişen aktivite veya yürüyüş, kambur duruş, ajitasyon, nöbetler ve ölüm ile karakterize edilmiş ve dozlamadan yedi saat sonra sinir sistemi işlevindeki değişiklikler kaydedilmiştir (Fung ve ark., 2003; Mohamed ve ark., 2004). İnsanlarda kazara fipronil zehirlenmesi vakaları da rapor edilmiştir ve fipronil zehirlenmesi kusma, ajitasyon ve nöbetlerle karakterize edilmiştir (Mohamed ve ark., 2004).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Sınıf II, nispeten toksik pestisid olarak sınıflandırılmıştır. Sıçanlarda 97 mg/kg akut oral öldürücü doz 50 (ÖD50)'ye ve 2000 mg/kg'dan daha yüksek dermal ÖD50'ye sahiptir (WHO, 2010). Fipronil, sıçanların her iki cinsiyetinde artan tiroid foliküler hücre tümörlerine bağlı olarak C grubu kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Gaines, 1969; WHO, 2010). Normal endokrin sistem fonksiyonunu değiştiren ve ciddi üreme etkilerine neden olan fipronil dahil olmak üzere bazı pestisitlerin erkek üremesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu kaydedilmiştir ve öldürücü olmayan konsantrasyonlarda farelerin üremesini etkileyebileceği öne sürülmüştür (Bencic ve ark., 2013; Wang ve ark. 2009). Fipronil memelilerde böceklerden daha düşük toksisite gösterse de ilacın hedef olmayan türlerde de böbrek, karaciğer, tiroid ve üreme organları üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Das ve ark., 2006; Ohi ve ark., 2004; Roques ve ark., 2013; Tingle ve ark., 2003). Farelerin fipronile (15, 25 ve 50 mg/kg c.a 7 gün süreyle) maruz kalmasının ardından, önemli karaciğer yağlanması, nekrozu ve hepatomegali bildirilmiştir (De Oliveira ve ark., 2012). Fipronilin ayrıca insan karaciğer mikrozomlarında testosteronun 6 β -hidroksilasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Tang ve ark., 2004). Bu nedenle, insektisit olarak hayvanlara uygulanması ve fipronil kalıntıları içeren farklı gıda ürünlerinin tüketimi yoluyla maruziyetinin uzun vadeli insan sağlığını etkilemesi nedeniyle fipronilin toksisitesine daha fazla dikkat edilmesi gerekmektedir (Wang ve ark., 2016).

2.1.1.4. Fipronilin Oksidatif Stres, İnflamasyon ve Apoptozis Mekanizmaları Üzerindeki Etkileri

Birçok *in vivo* ve *in vitro* deneyde, fipronilin karaciğer, beyin, böbrekler ve testisler dahil olmak üzere birçok organ sisteminde önemli histopatolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Khan ve ark., 2015; Lee ve ark., 2011; Vidau ve ark., 2011; Wang ve ark., 2016).

2.1.1.4.1. Fipronilin Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri

Oksidatif stres, yetersiz antioksidan savunma veya serbest radikallerin aşırı üretiminin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve hidroksil radikalleri (OH), süperoksid

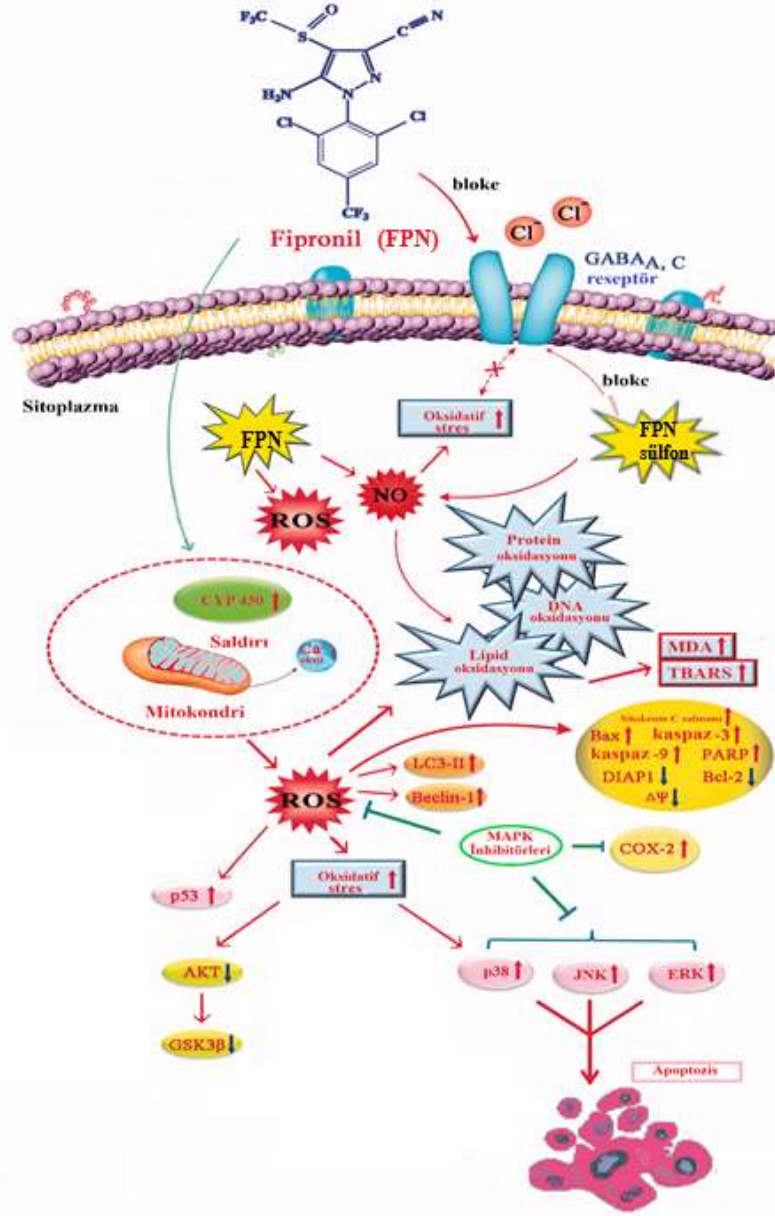
anyonları (O_2^-) ve perhidroksi radikalleri (HOO^-) ile nitrik oksit (NO) içeren reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) tarafından başlatılır (Dasuri ve ark., 2013; Swomley ve Butterfield, 2015).

Fipronil, ROS oluşumuna neden olmakta ve *in vivo* olarak toksik etkilere yol açan oksidatif stresi indükleyebilmektedir. Khan ve ark. (2015), sıçanlara fipronil (2,5, 5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) uygulandığında daha yüksek fipronil konsantrasyonlarının (5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) spermde ROS üretimini önemli ölçüde artırdığı belirtmişlerdir. Ayrıca fipronilin *in vitro* olarak indüklediği ROS üretimi üzerine birçok çalışma vardır (Lee ve ark., 2011; Vidau ve ark., 2011; Wang ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2015). SH-SY5Y hücrelerine 6 saat boyunca fipronil (100 μ M) uygulanması sonucunda fipronilin önemli miktarda ROS üretimini tetikleyebildiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2011). Zhang ve ark. (2015), *Drosophila* S2 hücrelerine 20, 30, 40 ve 50 μ g/mL fipronil uygulandığında fipronilin konsantrasyona bağlı olarak ROS'ta artışa neden olduğunu vurgulamışlardır. Wang ve ark. (2013), *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hücrelerinin 48 saat boyunca fipronile (200 ve 400 μ g/mL) maruz bırakıldığında fipronilin hücre içi ROS seviyesini önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir. Vidau ve ark. (2011) ise fipronil toksisitesinin kökenini daha ayrıntılı olarak araştırmak ve ROS oluşumunun nedenini ortaya çıkarmak için izole sıçan karaciğer mitokondrisini araç olarak kullanmışlar, fipronilin mitokondrideki oksijen tüketiminde doza bağlı bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Reaktif oksijen türleri üretiminin neden olduğu oksidatif stresle karşılaştırıldığında, RNS'nin neden olduğu oksidatif stres nadiren rapor edilmiştir. Hem fipronil (100 μ M) hem de fipronil sülfon (3,7 μ M) uygulamalarının, SH-SY5Y hücrelerinde NO üretiminde önemli artışlara yol açtığı belgelenmiştir ve bu oksidatif stresin fipronil kaynaklı nörotoksitenin ana mekanizmalarından biri olabileceğini göstermektedir (Romero ve ark., 2016). Bu nedenle *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, ROS veya RNS üretiminin, fipronilin neden olduğu oksidatif stres ve ilgili toksisitelere önemli rol oynadığını göstermiştir (Khan ve ark., 2015; Lee ve ark., 2011; Vidau ve ark., 2011; Wang ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2015). Ayrıca ROS veya RNS üretimi fipronil tarafından doza bağlı bir şekilde indüklenebilmektedir. Mitokondrinin

fipronilin önemli bir hedefi olabileceği ve mitokondriye verilen hasarın fipronilin neden olduğu toksisite ile yakından ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Özellikle fipronilin metaboliti olan fipronil sülfon, oksidatif strese dayalı toksisiteden sorumlu olabilmektedir bu da oksidatif stres ile fipronil metabolitlerinin neden olduğu toksisite arasındaki ilişkinin oldukça yüksek olması gerektiğini düşündürmektedir (Wang ve ark., 2016). Fipronilin neden olduğu oksidatif stres, antioksidan savunma sistemini değiştirebilir ve lipidler, DNA ve proteinler gibi hücresel makromoleküllerin hasar görmesine yol açabilir. Hücre ölümü, oksidatif stresi takiben apoptotik veya nekrotik mekanizmalarla meydana gelir (Clasen ve ark. 2012; Khan ve ark. 2015; Weidinger ve Kozlov 2015). Lipidlere, DNA'ya ve proteinlere fipronilin neden olduğu hasar Şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmektedir (Wang ve ark., 2016).

Lipid peroksidasyonundaki önemli artış, hücre zarı lipidlerindeki oksidatif hasarın sonucudur. Lipid peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) ve tiyobarbitürik asit reaksiyona giren maddelerdeki (TBARS) değişiklikler izlenerek ölçülebilir. TBARS'ın bir parçası olan MDA, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan en fazla miktardaki bireysel aldehittir ve düzeyi lipid oksidasyonunun bir belirtecidir (Zhou ve ark. 2015). Fipronil, *in vivo* lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde artırabilir. Erkek farelerde 28 gün boyunca birden fazla organda fipronil kaynaklı değişiklikleri araştıran çalışmalarda, fipronilin (2,5; 5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) karaciğer, böbrek ve beyin dokularında MDA düzeylerini önemli ölçüde artırdığı vurgulanmıştır (Badgujar ve ark. 2015; Badgujar ve ark. 2016). Fipronilin antioksidan durum üzerindeki etkilerini incelemek için, erkek buzağılar 98 gün boyunca fipronile (0,5 mg/kg vücut ağırlığı) maruz bırakıldığında, kontrole kıyasla eritrositlerde MDA seviyesinde %64,5'lik bir artış bildirmişlerdir (Gill ve Dumka, 2013).



Şekil 2.2. Fipronilin etki mekanizması (Wang ve ark., 2016).

Fipronil uygulanan hücre hatlarında da lipid peroksidasyonu gözlenmiştir. PC12 hücrelerine fipronil (30 ve 50 μM) uygulamasından sonra fipronilin MDA seviyelerinde önemli artışlara yol açtığı bildirilmiştir (Slotkin ve Seidler, 2010). Benzer şekilde fipronil, SH-SY5Y hücreleri 6 veya 24 saat boyunca fipronile (100 μM) maruz bırakıldığında, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında MDA konsantrasyonlarında önemli bir artışa neden olduğu belirtilmiştir (Ki ve ark. 2012; Romero ve ark. 2016). Ayrıca SH-SY5Y hücrelerinin fipronilin ana metaboliti olan

fipronil sülfona (3 µM) maruz bırakılmasından sonra fipronilin MDA düzeyini önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir (Romero ve ark. 2016). Bu nedenle fipronilin *in vivo* ve *in vitro* oksidatif strese bağlı toksisitesinde lipid peroksidasyonunun oldukça önemli olduğu öne sürülmektedir. Fipronil sülfon ayrıca sinir hücrelerindeki lipidlerde oksidatif hasara da neden olmaktadır. Ayrıca fipronilin neden olduğu lipid peroksidasyonu doza bağlı bir şekilde meydana gelebilmektedir (Wang ve ark., 2016).

Enzimatik antioksidan savunma sistemleri, O_2^- , OH ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hücre hasarını korumaktadır. *Glutasyon-S-transferaz* (GST), *süperoksit dismutaz* (SOD), *glutasyon redüktaz* (GR), *glutasyon peroksidaz* (GPx) ve *katalaz* (CAT) birincil antioksidan enzimlerdir ve hepsi redoks biyobelirteçleri olarak görev yapabilmektedir (Yang ve Lee, 2015). En fazla miktardaki hücre içi antioksidan olan glutasyon (GSH), hücrelerdeki OH'yı temizleyen önemli bir küçük moleküllü antioksidandır ve hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasında ve çeşitli detoksifikasyon mekanizmalarında rol oynamaktadır (Yadav ve Mishra, 2013). Glutasyon ayrıca GST, GR ve GPx'i içeren birçok temel enzimatik reaksiyonda bir yardımcı substrat olarak görev yapmaktadır ve GSH seviyesindeki bir azalma genellikle hücrelerin oksidanlara tepkisini bozmaktadır (Aydın, 2011).

Fipronil hayvanlardaki doku ve organların antioksidan durumunu önemli ölçüde değiştirebilmektedir (Wang ve ark., 2016). Kuşlar, 10 gün boyunca fipronile maruz bırakıldığında fipronilin, erkek kuşlarda kırmızı kan hücrelerindeki SOD aktivitesini artırma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir (Lopez-Antia ve ark., 2015). Fipronilin manda malaklarının antioksidan durumu üzerindeki etkileri de rapor edilmiştir. Gill ve Dumka (2013), fipronilin kan GSH düzeyinde %21,6 oranında anlamlı bir düşüşe yol açtığını ancak CAT, SOD ve GPx aktiviteleri üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca fipronilin suda yaşayan hayvanlarda antioksidan enzimleri de değiştirdiği bildirilmiştir. Sazan yavrularının 60 gün boyunca fipronile (0,0428 mg/L) maruz bırakıldığı çalışmada karaciğer ve solungaçtaki SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Gupta ve ark., 2013). Fipronilden etkilenen antioksidan enzimler *in vitro* çalışmalarda nadiren tespit edilmiştir. Sf9 hücrelerinin 48 saat boyunca fipronile (200 ve 400 µg/mL) maruz bırakıldığı çalışmada, hücre içi GSH seviyesinde ve SOD aktivitesinde kayda değer değişikliklere

neden olmadığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2013). Fipronile *in vivo* ve *in vitro* maruz kalmanın ardından farklı antioksidan enzimler, fipronile maruz kalmanın dozu ve süresi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlı olarak çeşitli tepkiler göstermektedir (Wang ve ark., 2016).

8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), mitokondri ve nükleer DNA'daki guanin bazının ROS kaynaklı 8-hidroksilasyonundan sonra spesifik enzimatik bölünmeyi takiben oksidatif DNA hasarının bir ürünüdür (Cooke ve ark., 2000). DNA'da ROS'un neden olduğu yirmi üç oksidatif baz bozulmasından en yaygın ve duyarlı olanı 8-OHdG'dir. Guanin, DNA'nın bileşenlerinden biridir ve en düşük iyonlaşma potansiyeline sahiptir. Aynı zamanda oksidasyona en yakın olan bileşiktir. Bu nedenle, ROS'ların hedefi olur. Hidroksil radikali, guaninin 4, 5 ve 8 numaralı karbon atomlarıyla tepkimeye girerek DNA hasar ürünleri oluşturur. Bu hasar ürünlerinden biri olan 8-OHdG, guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalının saldırmasıyla oluşur. 8-OHdG, DNA hasarını tespit etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Koç ve Akçay, 2018). Hasarlı DNA onarıldığında, üretilen 8-OHdG daha fazla metabolize edilmeden idrarla atılır. Üriner 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının ve *in vivo* toplam sistemik oksidatif stresin hassas bir belirteci olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Loft ve ark., 1992).

2.1.1.4.2. Fipronilin Yangı Üzerindeki Etkileri

Oksidatif stres, inflamasyonun gelişmesinde ve yayılmasında kritik bir rol üstlenmektedir. Oksidanlar, vücuttaki hasarlı dokulardan salınan ve endojen tehlike sinyalleri olarak işlev gören moleküller arasında yer almaktadır. Bu tür moleküller, hücre hasarı, doku stresi veya enfeksiyon gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bu oksidanlar, özellikle Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve NOD benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi doğuştan gelen bağışıklık reseptörleri tarafından algılanmaktadır. Toll benzeri reseptörler ve NLR'ler, vücudun bağışıklık sisteminin önemli parçalarıdır ve dışarıdan gelen patojenleri algılamak ve bağışıklık yanıtını başlatmak için gelişmişlerdir. Ancak, bu reseptörler aynı zamanda hasarlı hücrelerden veya doku hasarından kaynaklanan endojen tehlike sinyallerini de algılayabilmektedirler. Oksidanlar, bu reseptörlerin aktivasyonunu tetikleyerek inflamatuvar yanıtın çeşitli

aşamalarını etkilemektedirler. TLR'ler tarafından tetiklenen yanıtlar, öncelikle transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF- κ B)'nin aktivasyonu ile iletilmektedir (Lugrin ve ark., 2014). Nükleer faktör kappa B, oksidatif stres ve yangı gibi çeşitli biyolojik süreçler arasında önemli bir köprü veya kavşak noktası olarak kabul edilir. Nükleer faktör kappa B, hücresel yanıtları düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve çeşitli uyaranlara tepki vererek bir dizi genin ifadesini düzenleyebilir. Oksidatif stres, ROS'un aşırı üretimi veya hücredeki antioksidan savunma mekanizmalarının azalması sonucu hücrelerdeki dengeyi bozan bir durumdur. Bu durum, NF- κ B'nin aktivasyonuna yol açabilir. Nükleer faktör kappa B' nin oksidatif stres tarafından aktive edilmesi, hücrelerdeki inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bakteriyel lipopolisakkaritler gibi pro-inflamatuvar sitokinler veya enfeksiyonlara yanıt olarak da NF- κ B aktivasyonu gerçekleşebilir. Bu durum, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmalarını harekete geçirir ve yangıyı başlatır (Gloire ve ark., 2006).

Oksidatif stres, nörotoksik maddeler ve inflamatuvar uyaranlarla ilişkili hücre hasarının önemli bir nedenidir. Oksidatif stres sırasında üretilen ROS inflamatuvar yanıtla ilişkilidir ve mitojenle aktifleşen protein kinazın (MAPK) yolağının düzenlenmesi yoluyla tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimine katkıda bulunur (Watanabe ve ark., 2015). Prostaglandinlerin sentezini katalize eden bir enzim olan *siklooksijenaz-2* (COX-2) ise çevresel stres ve proinflatuar sitokinler gibi çeşitli uyaranlara anında yanıt veren bir proteindir (Narita ve ark., 2008). Siklooksijenaz-2 normal fizyolojik koşullar altında çoğu dokuda neredeyse tespit edilemez ancak COX-2 aktivasyonundan sonra artan prostaglandin üretimi nöronlarda toksisiteye neden olabilir. Bu şekilde COX-2, beyindeki strese verilen nöronal tepkide rol oynayabilir (Manabe ve ark., 2004). p38/MAPK yolağı, proliferasyonu engelleyebilen veya apoptozisi destekleyebilen oksidatif strese karşı yanıt olarak fosforile edilir (Watanabe ve ark., 2015). Mitojenle aktifleşen protein kinazın ailesine ait c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), nörotransmitterler, hormonlar, büyüme faktörleri ve oksidatif stres gibi çeşitli stres türleri dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı uyaranlara yanıt verir (Gong ve ark., 2015; Kim ve ark., 2015; Liao ve ark., 2015; Romanov ve

ark., 2015). Mitojenle aktifleşen protein kinazın ailesi üyeleri, COX-2 ekspresyonunun ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Nieminen ve ark., 2005). Park ve ark. 2016, fipronilin SH-SY5Y hücreleri üzerinde indüklediği toksik etkilerin artan inflamatuvar stimülasyonla sonuçlanıp sonuçlanmadığını araştırdıkları çalışmalarında fipronilin toksik etkisinde MAPK yollarının dahil olduğunu bildirmişlerdir. Hücreleri (0, 30 dakika, 1, 3, 6 ve 12 saat) 100 µM fipronile maruz bırakmışlar ve fipronil maruziyetinin konsantrasyona bağlı bir şekilde COX-2 ve TNF-α ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığını belirtmişlerdir. Böylece SH-SY5Y hücrelerinde fipronilin indüklediği apoptotik sinyallemede inflamatuvar yanıtın rol oynayabileceğini vurgulamışlardır.

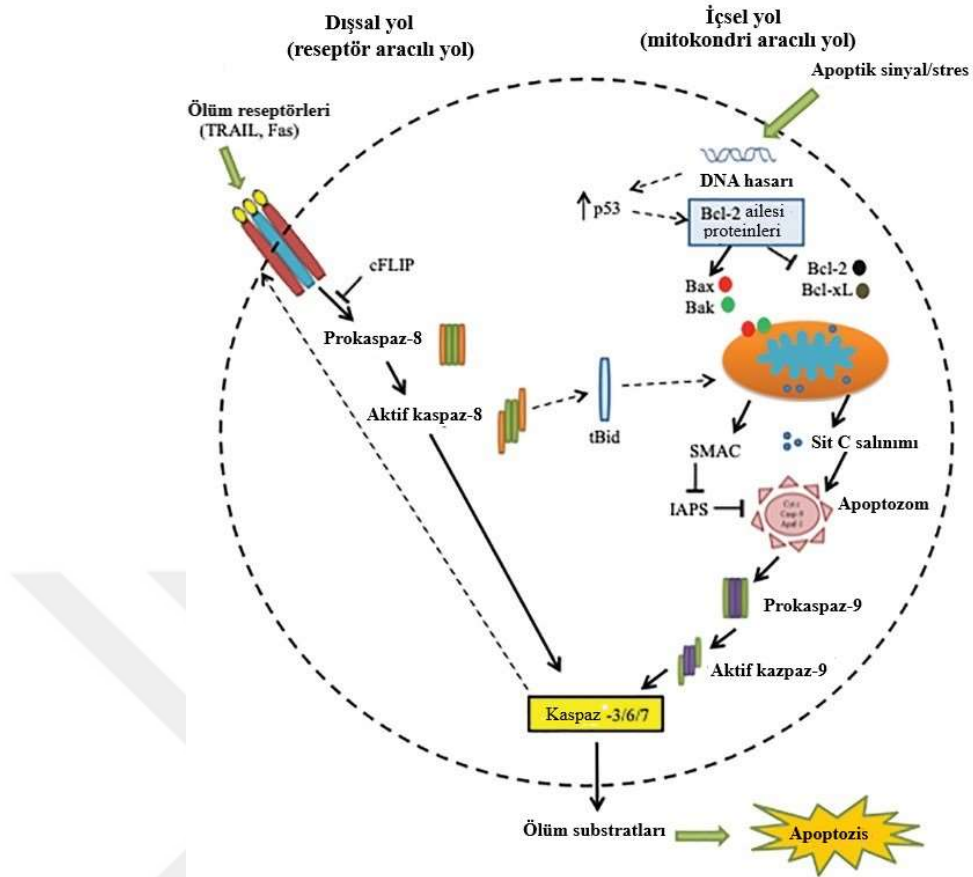
2.1.1.4.3. Fipronilin Apoptozis Üzerindeki Etkileri

Hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişiminde, doku homeostazisinde ve bütünlüğünde önemli bir süreçtir. Hücre proliferasyonu ve eliminasyonu, yetişkin organizmada fizyolojik süreçlerin homeostazisini sürdürmek için gereklidir (Galluzzi ve ark., 2012). İstenmeyen hücreler metamorfoz, embriyogenez, patogenez ve ayrıca doku dönüşümü süreci sırasında uzaklaştırılır (Trump ve ark., 1997). Hücre ölümü programlanmış hücre ölümü ve nekroz olmak üzere iki geniş tanımlı mekanizmayı içerir (Fuchs ve Steller, 2011). Belirli sinyallere yanıt oluşturarak genetik olarak programlanmış bir hücre intiharı sürecini içeren hücre ölümüne programlanmış hücre ölümü denir (Gorski ve Marra, 2002). Genellikle programlanmış hücre ölümü, hücre dışı ve hücre içi sinyaller tarafından kontrol edilir. Programlanmış hücre ölümü, farklı morfolojik özelliklere sahip olması, doku homeostazisini koruması ve istenmeyen hücreleri ortadan kaldırarak çok hücreli organizmalarda uygun hücre sayısını düzenlemesi nedeniyle hücre nekrozundan ayrılır (LeBlanc, 2003). Farklı endojen dokuya özgü ajanlar ve eksojen hücreye zarar veren ajanlar, kritik fizyolojik koşullar altında belirli hücre tipinde programlanmış hücre ölümünü başlatır. Programlanmış hücre ölümünün eksojen aktivasyonları, çoğu hücre tipi üzerinde etkili olan fiziksel ajanları ve enfeksiyöz ajanları içerir. Fiziksel ajanlar arasında radyasyon, fiziksel travma ve kemoterapötik ilaçlar bulunurken, enfeksiyöz ajanlar arasında virüsler ve bakteriyel toksinler yer alır. Ayrıca büyüme faktörlerinin çekilmesi, bir trofik hormonun ablasyonu, glukokortikoidlerle tedavi ve matriks ekinin kaybı gibi iç

dengelesizlikler apoptozu tetikleyebilir (Neuman ve ark., 2001). Her ne kadar çeşitli araştırma grupları sıklıkla programlanmış hücre ölümünü apoptozis ile eşitlese de sonra yapılan çalışmalar apoptozis mekanizmasının katılımından yoksun olan programlanmış hücre ölümünün apoptotik olmayan formlarının da mevcut olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle programlanmış hücre ölümü ve apoptozis hiçbir zaman eşanlamlı olarak düşünülmemelidir (Bredesen ve ark., 2006).

Apoptozis yalnızca hücre hasarı veya dış stresin bir sonucu olarak değil aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında da meydana gelen, düzenlenmiş ölümün önemli bir mekanizması olarak tanımlanır (Nikoletopoulou ve ark., 2013). Apoptozis, uygulayıcı ve düzenleyici moleküllerin farklı grupları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması tipik olarak kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte meydana gelen DNA parçalanması, hücre büzülmesi, dinamik membran taşması ve hücre dışı matrikslere yapışma kaybı ile karakterize edilir. Ayrıca biyokimyasal değişiklikler arasında; fosfatidilserinin dışsallaşması ve kaspaz adı verilen sistein aspartil proteazların aktivasyonu hücre ölümüne yol açar (Kerr ve ark., 1972; Nikoletopoulou ve ark., 2013). Apoptozis mekanizması temel olarak apoptozun indüklenmesinde rol oynayan dışsal yol ve içsel yol olarak adlandırılan iki temel yoldan oluşur. Dışsal yol, ölüm reseptörleri aracılı yolu ifade ederken içsel yol mitokondriyal aracılı bir yoldur. Bu apoptotik yolların her ikisi de aynı terminale (yürütme yoluna) yol açabilmektedir (Elmore, 2007; Jan, 2019) (Şekil 2.3).

Kaspazlar apoptozisin temel başlatıcıları ve uygulayıcılarıdır ve işlevleri, farklı substrat tercihlerine sahip olan yapısıyla çok yakından ilişkilidir. Bazı kaspazlar, diğer proteinlerle etkileşime izin veren ve sinyal yollarına bağlanan, ölüm efektör alanı ve kaspaz toplama alanları gibi belirli bölgeleri içeren uzun pro-alanlara sahiptir. Ölüm efektör alanı kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içerirken kaspaz toplama alanları kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-9, kaspaz-11 ve kaspaz-12'i içerir. Kaspazlar geleneksel olarak apoptotik sinyalleşme basamaklarındaki konumlarına göre başlatıcı, efektör veya yürütücü kaspazlar olarak sınıflandırılır (Ghavami ve ark., 2009).



Şekil 2.3. Apoptoz yolları (Jan, 2019).

İçsel yol, esas olarak mitokondriyal aracılı apoptotik yola karşılık gelir ve oksidatif stres, ışınlama, sitotoksik ilaçlarla tedaviyi içeren çeşitli hücre dışı ve hücre içi stresler tarafından tetiklenmektedir. B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ve Bcl-xL (Bcl-2 aile üyesi), sitokrom c salınımını önleyen anti-apoptotik proteinlerdir (Kim, 2005). Sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom üretir. Apoptozom, kaspaz 9'u tetikleyen ve ardından hücrelerin yıkımına yol açan ve apoptozla sonuçlanan kaspaz-3 sinyal kaskadının aktivasyonunu sağlayan yedi kollu halka şeklinde çok proteinli bir komplekstir (Yuan ve Akey, 2013). Hem dışsal hem de içsel yollar yürütme aşamasında birleşir. Yürütme aşaması apoptozisin son yolunu ifade eder. Kaspaz-8 ve 9 başlatıcı kaspazlardır; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, Kaspaz-10, Kaspazla aktive edilen DNA (CAD) ve Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) efektör veya uygulayıcı kaspazlar olarak sınıflandırılır (Hengartner, 2000). Kaspazlar çok sayıda hedef proteinin bölünmesi yoluyla apoptotik

hücre ölümünü düzenler. Yol, sitoplazmik endonükleazı daha da aktive eden yürütme kaspazlarının aktivasyonu ile başlar. Sitoplazmik endonükleaz, nükleer materyali ve proteazları parçalar ardından nükleer ve hücre iskeleti proteinleri parçalanır. Tüm yürütücü kaspazlar arasında kaspaz-3 en önemlisidir ve başlatıcı kaspazlardan herhangi biri onu aktive edebilir. Endonükleaz kaspazla aktive edilen DNA, kaspaz-3 tarafından açıkça aktive edilir ve bu da çekirdeklerdeki kromozomal DNA'nın bozulmasına ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (Green ve Evan, 2002). Oksidatif stres, çok sayıda biyolojik yanıtta ve hücre sinyal yollarında önemli bir rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türleri üretimi oksidatif strese neden olmakta ve dolayısıyla apoptozis ile sonuçlanmaktadır (Jin ve ark., 2014; Chtourou ve ark., 2015). Fipronil maruz kalmanın, artan ROS üretimi ve oksidatif stresin aracılık ettiği farklı hücre hatlarının *in vitro* modellerinde apoptozise neden olduğu belirtilmiştir (Hu ve ark., 2010; Lee ve ark., 2011; Park ve ark., 2016; Vidau ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2015). Hu ve ark. (2010), PC12 hücrelerinde 3,13 μ M fipronil uygulamasının ROS üretiminde ve apoptozisde önemli bir artışa yol açtığını bildirmişlerdir. SH-SY5Y hücrelerinde ise 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulanan fipronil (25, 50, 100 veya 200 μ M) sonrasında fipronil konsantrasyonu ve zamana bağlı bir şekilde hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı vurgulanmıştır (Lee ve ark. 2011; Park ve ark. 2016; Vidau ve ark. 2011). Zhang ve ark. (2015), 24 saat boyunca fipronil (20, 30, 40 ve 50 μ g/mL) uygulamasından sonra, apoptotik hücrelerin oranının doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde arttığını ve artan sayıda S2 hücrelerinin küçülmeye başladığını bildirmişlerdir. p53 sinyal yolunun, nöronal hücre ölümünde apoptotik sinyalleşmeye dahil olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2016). SH-SY5Y hücrelerine 24 saat boyunca fipronil (100 μ M) uygulanması sonucunda fipronilin nükleer p53 birikimine neden olduğu ve ardından sitozolik p53 seviyesinin arttığı belirtilmiştir (Lee ve ark. 2011). Benzer şekilde, SH-SY5Y hücrelerinin 24 saat boyunca fipronil (25, 50 ve 100 μ M) maruz bırakılmasının sonucunda, tüm hücrelerde p53 aktivitesinin arttığı ve fipronil konsantrasyonuna bağlı bir ortamda sitoplazmik p53 seviyelerinin yanı sıra p53 nükleer birikiminin artmasına yol açtığı bildirilmiştir (Park ve ark. 2016).

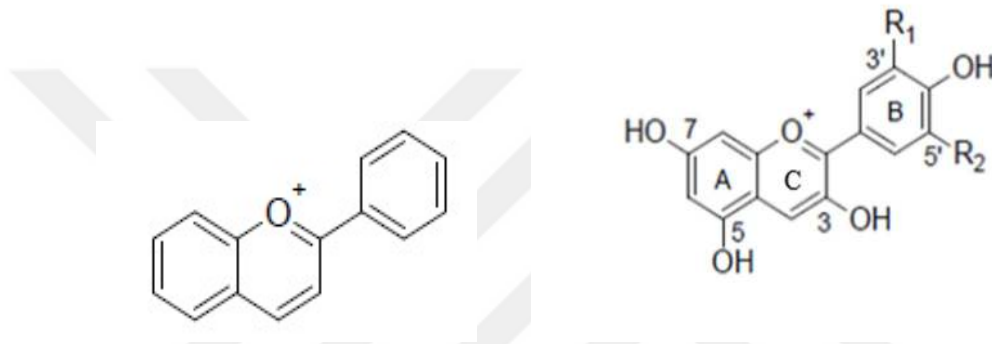
Artan ROS üretiminin, apoptozis sırasında meydana gelen kritik bir olay olarak kabul edilen mitokondriyal sitokrom C'nin sitozole salınmasını tetiklediği belirtilmiştir

(Lee ve ark., 2011; Li ve ark., 2012; Sumedha ve Miltonprabu, 2015). Mitokondri apoptozisde merkezi bir rol oynar ve mitokondriyal hasar, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax)'nin sitozolden mitokondriye translokasyonunu indüklerken mitokondride Bcl-2 ekspresyonunu azaltır (Park ve ark. 2016). Kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi kaspaz ailesi üyeleri apoptozis için çok önemlidir ve mitokondriyal olaylara katkıda bulunurlar (Lakhani ve ark., 2006; Das ve ark., 2012). Kaspaz-3, PARP dahil olmak üzere birçok hücrel proteini sınırlı proteoliz ile parçalayabilmektedir (Ki ve ark., 2012). Ek olarak kaspaz-3, ROS üretimi ile aktive edilebilir ve dolayısıyla hücre apoptozisini ve nekrozunu indükleyebilir (Junn ve Mouradian, 2001). Ayrıca Bcl-2 ve Bax gibi Bcl-2 ailesi üyeleri, mitokondriyal bütünlüğün ve mitokondri tarafından başlatılan sitokrom C salınımının ve kaspaz aktivasyonunun ana düzenleyicileridir (Lee ve ark., 2011). Hu ve ark. (2010), PC12 hücrelerine fipronil (3,13 μ M) uyguladıkları çalışmalarında, ROS üretiminde önemli bir artışla birlikte Bcl-2 protein ekspresyonunda önemli bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca SHSY5Y hücrelerinde fipronil uygulamasının, konsantrasyona bağlı bir şekilde (25, 50 veya 100 μ M), sitokrom C salınımını ve Bax'ın mitokondriyal translokasyonunu önemli ölçüde arttırdığı kaspaz-3, kaspaz-9 ve PARP'ın aktivitesini arttırdığı ve Bcl-2 seviyesini düşürdüğü çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Ki ve ark., 2012; Lee ve ark., 2011; Park ve ark., 2016). Fipronilin (20, 30, 40 ve 50 μ M), S2 hücrelerinde ROS üretiminde bir artışa neden olduğu, bunun da mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalma, Bcl-2'nin *Drosophila* inhibitörü apoptoz proteini 1 (DIAP1)'de önemli bir azalma ve sitokrom C, kaspaz-3 ve kaspaz-9'da belirgin artışa neden olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2015). Bu bulgular fipronilin, ROS üretimi tarafından başlatılan mitokondriyal içsel sinyal yoluyla apoptozisi tetiklediğini göstermektedir (Wang ve ark., 2016).

2.2. Antosiyaninler

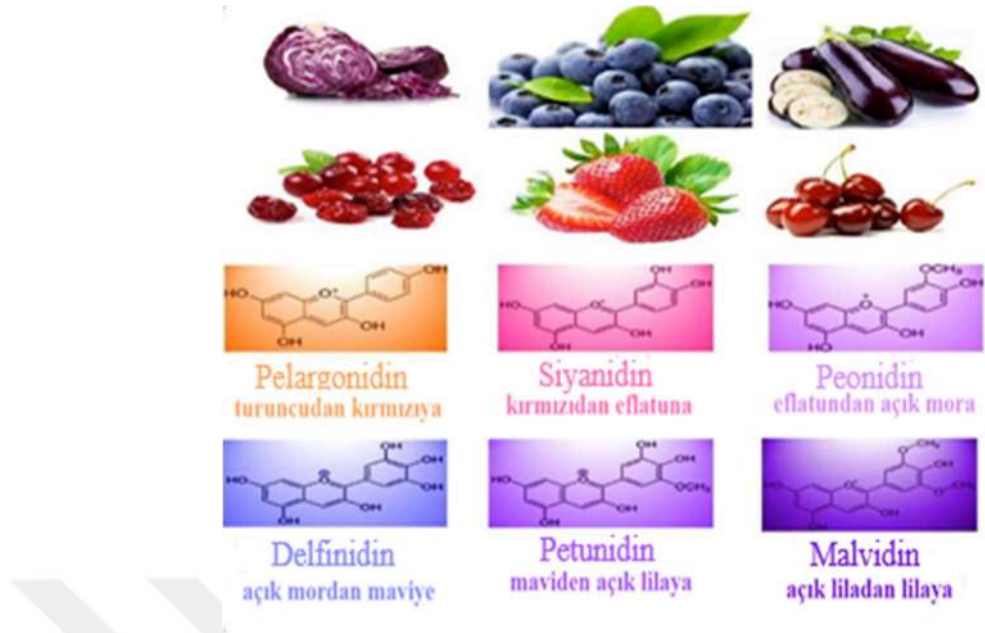
Antosiyaninler flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir ve diğer flavonoidlerden flavilyum katyonu oluşturma yetenekleri nedeniyle ayrılırlar (Mazza, 2007). Antosiyanin kelimesi Yunanca çiçekler anlamına gelen 'anthos' ve koyu mavi anlamına gelen 'kyanos' kelimelerinden türemiştir (Horbowicz ve ark., 2008). Başlıca antosiyanin kaynakları yaban mersini, kiraz, ahududu, çilek, siyah kuş üzümü, mor üzüm ve kırmızı şaraptır (Prior ve Wu, 2006). Antosiyaninler, antosiyanidinler temel

yapısına sahiptir. Antosiyanidinler (veya aglikonlar), oksijen içeren heterosiklik halkaya [C] bağlı aromatik bir halkadan [A] oluşur ve bu da üçüncü bir aromatik halkaya [B] bir karbon-karbon bağıyla bağlanır (Konczak ve Zhang, 2004). Antosiyanidinler glikozit formunda (bir şeker kısmına bağlı) bulunduklarında “antosiyaninler” olarak bilinirler. Bu moleküllerin sergilediği renk ilk kez 1939'da Pauling tarafından açıklanmıştır (Mazza, 2007; Wrolstad ve ark., 2005) (Şekil 2.4). Antosiyaninler içinde en yaygın bulunanı siyanidindir ve diğerleri ise delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin ile malvidindir (Harborne, 1998).



Şekil 2.4. Flavilyum katyonu ve antosiyaninlerin temel yapısı (Mazza, 2007).

Temel antosiyanidin yapısı üzerindeki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısına ve pozisyonuna göre çeşitli antosiyaninler oluşmaktadır (Prior ve Wu, 2006). Aralarındaki temel farklar hidroksil gruplarının sayısı, yapılarına bağlı şekerlerin çeşidi ve sayısı, şekere bağlı alifatik veya aromatik karboksilatlar ve bu bağların pozisyonlarıdır (Kong ve ark., 2003). Antosiyaninlerin biyolojik aktiviteleri önceki çalışmalarda, antioksidan özellikleriyle yakından ilişkili olmasına rağmen çoğunlukla B halkası hidroksil gruplarına ve konjuge çift bağ sistemine atfedilir (Nöthlings ve ark., 2008; Pascual-Teresa ve ark., 2010). Ayrıca yapıda bulunan hidroksil ile metoksil grupları antosiyaninin rengini etkiler. Eğer hidroksil grupları baskınsa, renk daha maviye fakat metoksil grupları baskınsa renk daha kırmızıya doğru gider (Heredia ve ark., 1998; Horbowicz ve ark., 2008; Tena ve ark., 2020) (Şekil 2.5).



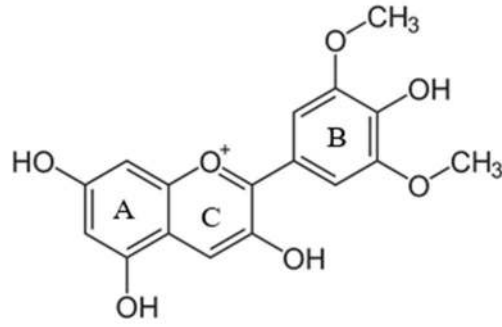
Şekil 2.5. Antosiyaninlerin doğal kaynakları (Tena ve ark., 2020).

Antosiyaninler üzümelerde ve şaraplarda flavilyum iyonları olarak bulunur. Flavilyum iyonu sindirim sırasında artan pH'ta karbinol psödo-baz, kuinoidal-baz veya kalkona dönüşür ve kana geçer. Antosiyanin pigmenti asidik koşullarda kırmızı, alkali koşullarda mavimsi mor gibi görünmektedir. Bu renkli pigmentler genellikle çiçekler, frenk üzümü, mor renkli meyve ve sebzelerden elde edilir. Antosiyaninler hem suda hem de organik çözücülerin (özellikle alkol) çoğunda çözünür. Aksine antosiyaninler apolar organik çözücülerde çözünmezler. Ayrıca alkali veya nötr solüsyonlarda stabil değildir (Lapidot ve ark., 1999).

2.2.1. Malvidin

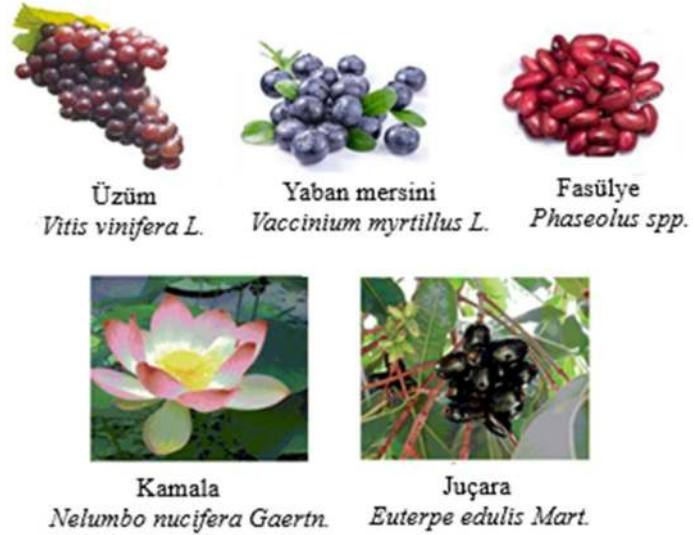
2.2.1.1. Malvidinin Kaynakları ve Kimyasal Yapısı

Kimyasal yapısı 3,4',5,7-tetrahidroksi-3',5'-dimetoksiflavilyum 3,5,7-trihidroksi 2-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-1-benzopirilyum olan malvidin, O-metillenmiş antosiyanidindir (Khoo ve ark., 2017) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Malvidinin kimyasal yapısı (Khoo ve ark., 2017).

Malvidin mor bir renge (özellikle yaz dalgası mavisi) sahiptir ve mavi renkli çiçeklerde bol miktarda bulunur. Malvidin ayrıca kırmızı şaraptaki başlıca kırmızı pigmenttir. Olgunlaşmış kırmızı şaraplarda daha koyu tozlu kırmızı olarak görünür. Malvidin üzüm türleri (*Vitis vinifera* L.), yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L., *V. corymbosum* L.), kırmızı fasülye (*Phaseolus spp.*), kamala (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ve juçara (*Euterpe edulis* Mart.) gibi çeşitli meyve ve sebzelerde bulunur (Zhang ve ark., 2019) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Malvidinin doğal kaynakları (Zhang ve ark., 2019).

Malvidin, alkole kıyasla suda daha iyi çözünür (Iosub ve ark., 2015). Suda çözünürlüğü, artan asilasyon dereceleri ile azalır (Barnard ve ark., 2011). Malvidinin hafif asidik ve nötr solüsyonları karakteristik olarak kırmızı, bazik solüsyonları ise mavi renktedir. Yüksek pH koşulunda ($\text{pH} > 7$) asillenmiş malvidinin parçalanmasından siringik asit oluşur (Srinivas ve ark., 2011). Malvidinin parçalanması sonucu ortaya çıkan siringik asit, Eski Mısır içeceği olan 'shedeh' içeren kavanozların incelenmesinde ortaya çıkmıştır (Guasch-Jané ve ark., 2006). Ayrıca Ermenistan'ın Areni köyündeki Areni-1 mağarasında 6.100 yıllık bir şaraphanede malvidin içeren şaraplar 2007 yılında bulunmuştur (Barnard ve ark., 2011).

2.2.1.2. Malvidinin Farmakokinetiği

Antosiyaninler geleneksel olarak bir fitofarmasötik, iştah uyarıcı, koleretik ajan olarak ve diğer birçok hastalığın tedavisi için kullanılmıştır. Bu renkli pigmentler, güçlü nutrasötik veya farmasötik bileşenlerdir. Biyoyararlanımı yüksek olan antosiyaninler, hücresel lipid peroksidasyonunu etkili bir şekilde önleyerek birçok hastalık riskini azaltır (Khoo ve ark., 2017). Antosiyaninler arasında, en çok siyanidin-3-glukozitin ve malvidin-3-glukozitin (Mv3-glc) biyoyararlanımı hakkında veriler bulunmaktadır. Kırmızı şarap antosiyaninlerinden peonidin glikoziti en yüksek nispi biyoyararlanıma sahiptir. Bunu siyanidin, malvidin, delfinidin ve petunidin glikozitleri izlemektedir (Frank ve ark., 2003).

Antosiyaninlerin oral biyoyararlanımı ile ilgili çalışmalar azdır. Ancak antosiyaninlerin, Mv3-glc örneğinde olduğu gibi tükürük proteinleri ile etkileşime girerek çeşitli faktörler aracılığıyla parçalanabileceği bildirilmiştir (Ferrer-Gallego ve ark., 2015). Yiyecek veya içecek alımı da antosiyanin biyoyararlanımını etkileyebilir. Ayrıca aç karna antosiyaninlerle birlikte süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi biyoyararlanımını azaltmaktadır (Xiao ve ark., 2017). Önemli bir antosiyanin olan Mv3-glc ile yapılan bir çalışmada antosiyaninlerin mideden emildiği tespit edilmiştir (Passamonti ve ark., 2003). Bu bulgu, gönüllülere uygulanan yaban mersini özleri ile yapılan çalışma ve üzüm (*Vitis vinifera*) özütlerinin sıçanlara doğrudan mideye (proksimal ve distal olarak bağlanmış) verildiği çalışma ile doğrulanmıştır (Mueller ve ark., 2017; Vanzo ve ark., 2008). Midede antosiyaninlerin emilimi üzerine yapılan

çalışmalar, geçişin büyük olasılıkla hücre membranlarında bir çeşit aktif taşıma ile sağlandığını ancak yapılarında çok sayıda hidroksil grubunun varlığından dolayı pasif taşınmanın mümkün olmadığını ortaya koymuştur (Smeriglio ve ark., 2016). Antosiyaninlerin mide mukozasına geçmesi hem organik anyonik membran taşıyıcı (bilitranslokaz) hem de glikoz taşıyıcıları (GLUT) vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Krga ve Milenkovic, 2019; Passamonti ve ark., 2002). Ayrıca insan mide epitel hücrelerini (MKN-28, orta derecede farklılaşmış adenokarsinom mide hücreleri) içeren deneysel modele dayanan çalışmada Mv3-glc'nin, GLUT1 ve GLUT3 vasıtasıyla emildiği tespit edilmiştir. Bu deneysel modelde atropinin (organik katyon taşıyıcı inhibitörü) ve verapamilin (bir P-glikoprotein inhibitörü) Mv3-glc'nin emilimini artırdığı belirlenmiştir (Oliveira ve ark., 2019). Mide mukozasında antosiyaninlerin emilimine de katılabilen başka taşıyıcılar [organik anyon taşıyıcılar (OAT2), sodyum/monokarboksilat taşıyıcılar (SMCT1 ve SMCT2)] tespit edilmiştir. Antosiyaninler mide pH'sında (1,5-4) glikozit formunda kaldıkları için midede yıkımlanmadığı düşünülmektedir (Fernandes ve ark., 2014).

Antosiyaninler ince bağırsaktan ya sodyuma bağlı glukoz kotransporter (SGLT1), GLUT2 ve bilitranslokaz taşıyıcılar kullanılarak aktif taşıma yoluyla ya da pasif difüzyonla emilir (Figueira ve ark., 2017). Antosiyaninlerin taşıma etkinliğini ve biyoyararlanımını belirlemek için insan epitelyal kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücre hatları kullanılarak bağırsak emiliminin araştırıldığı bir çalışmada yaban mersini özleri için ortalama %3-4'lük düşük bir oranla taşındığı belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2014). Öte yandan kırmızı üzüm kabuğundan ve siyah frenk üzümü ekstrelerinden gelen bazı antosiyaninlerin taşınmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, aynı deneysel modelde mor havuç (%44,62) ve patates (%71,8) antosiyaninlerinin aynı oranda emilmediği ve patatesin biyoyararlanımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Faria ve ark., 2009). Duodenum, jejunum ve ileumdaki antosiyanin emiliminin antosiyanin yapısına bağlı olarak tek tip olmadığı belirlenmiştir (Fang, 2014; Lila ve ark., 2016).

Antosiyaninlerin emilimi, gıdanın çeşidi ve kimyasal yapısına bağlı olarak değişmektedir (Talavéra ve ark., 2004). Bağırsak mikrobiyotasının antosiyanin metabolizmasıyla ilgili özel bir rolü vardır. Bu durum antibiyotikle tedavi edilen farelerde dışkıda artan antosiyanin içeriğinin görülmesi ile belirlenmiştir (Esposito ve

ark., 2015). Bağırsak mikrobiyotası bireye özgüdür bu nedenle bu seviyedeki antosiyanin metabolizması değişkenlik göstermektedir. Bu antosiyaninleri metabolize eden bakteri türleri üzerinde *in vitro* denemeler ve normal fizyolojik koşullar altında antosiyanin dışkı atılımı üzerine çalışmalar oluşturulmuştur ancak bu yönleri tam olarak aydınlatılamamıştır (Bresciani ve ark., 2019; Hanske ve ark., 2013; He ve ark., 2005).

2.2.1.3. Malvidinin Antioksidan Etkileri

Canlı organizmalar fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmek için redoks sistemine sahiptir. Organizmalar hayatta kalabilmek için az miktarda serbest radikallere ihtiyaç duyarlar (Nagy, 2001; Dröge, 2002). Nitrik oksit ve O_2^- gibi bazı serbest radikaller, sinyal verme süreçlerinde hücrelere aracılık eder (Dröge, 2002). Ancak redoks homeostazında dengesizlik olduğunda oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres, kalp damar hastalığı, kanser ve yaşlanma gibi kronik dejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (Dai ve Mumper, 2010).

Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyen, oksidatif stresi azaltan, oksitlenebilir materyallerin oksidasyonunu geciktirebilen veya önleyebilen bileşikler olarak tanımlanabilir. Oksidatif bir dizide antioksidanlar; lokalize oksijen konsantrasyonlarını azaltarak, ROS/RNS türlerini temizleyerek, metal iyonlarını $HO^\cdot$, ferri veya ferro demir (Fe^{2+}/Fe^3) + O_2 gibi türleri oluşturmayacak şekilde bağlayarak ve lipid peroksitleri peroksil ve alkoksil radikallerine ayrıştırarak, peroksitleri alkoller gibi radikal olmayan ürünlere dönüştürerek etki gösterirler (Dai ve Mumper, 2010; Miguel, 2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fitokimyasallar oksidatif hasarı, hastalığın ilerlemesini ve kanser gelişimini önleyebilir (Miguel, 2011).

Flavylium katyonunun (AH⁺) benzersiz yapısı, antosiyaninlere belirgin antioksidan özellikler kazandırır (Ali ve ark., 2016; Tena ve ark., 2020). Bu bileşikler reaktif radikal türleri, tek elektron transfer reaksiyonu veya hidrojen atomu transfer mekanizması yoluyla nötralize edebilir. Tek elektron transfer reaksiyonunda antioksidan, serbest radikali nötralize etmek için ona bir elektron verirken, hidrojen atomu transfer mekanizmasında ise antioksidan serbest radikale bir hidrojen atomu

vererek radikali stabilize eder. Her iki mekanizma genellikle aynı anda meydana gelir ve reaksiyon mekanizması antioksidanın yapısı, çözünürlüğü, bölünme katsayısı ve solvent polaritesi tarafından belirlenir (Enaru ve ark., 2021; Schlesier ve ark., 2002).

Antosiyaninlerin güçlü antioksidatif aktiviteleri bulunur. Antosiyanin kalkanları ve keto grubunda konjuge çift bağa sahip kuinoidal bazlar, serbest radikalleri temizlemede etkili antioksidanlardır (Bors ve ark., 1990). Ayrıca antosiyaninlerin glikosile edilmiş B halka yapısı antioksidan aktivite için oldukça önemlidir (Wang ve ark., 1997). Aslında antosiyanidin, antosiyaninden daha yüksek oksijen radikali absorbans kapasitesine sahiptir. Bu durumun sebebi antosiyanin aglikonunun çok kararsız ve oldukça reaktif olmasıdır (Stintzing ve ark., 2002). Heterosiklik C halkasında C-3 pozisyonunda fazladan şeker ilavesiyle antosiyanin, tek bir şeker molekülü bulunan antosiyanidinden daha düşük antioksidan aktiviteye sahiptir (Tamura ve Yamagami, 1994).

Lapidot ve ark. (1999), Mv3-glc'nin antioksidan aktivitesini diğer antioksidanlarla karşılaştırdıkları çalışmalarında; hidrojen peroksit uygulanan miyoglobinde Mv3-glc'nin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Ma ve ark., (2020) *in vitro* sıçan aktif karaciğer Kupffer T6 hücrelerinde malvidinin apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, yüksek malvidin konsantrasyonunun apoptozu önemli ölçüde indüklediği ayrıca kaspaz-3'ü aktive ettiği, MDA düzeylerini artırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, yaban mersini antosiyaninlerinden özellikle malvidinin önemli bir biyoaktif bileşen olduğunu ve karaciğer koruyucu bir nutrasötik olduğunu belirtmişlerdir.

Özet olarak malvidin ve glikozidleri, serbest radikalleri nötralize etmek için bir elektron veya hidrojen atomu vererek güçlü antioksidan aktivite sergiler. Bu etki şekline ek olarak ROS üretiminde yer alan enzimleri de inhibe ederler; antioksidan savunmalarını düzenler veya korur ve zararlı bileşikleri parçalayan GPx, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimleri indüklerler. Genel olarak bu bulgular, malvidin ve glikozidlerinin oksidatif stresi bloke etme potansiyeline sahip olduğunu ve bunların bir antioksidan madde olarak yararlı olduğunu göstermektedir (Merecz-Sadowska ve ark., 2023).

2.2.1.4. Malvidinin Antiinflamatuvar Etkileri

Birçok bulaşıcı hastalığın bilinen en önemli belirtisi olan yangının aynı zamanda bulaşıcı olmayan hastalıklarla da (örneğin ateroskleroz, osteoartrit gibi) yakından bağlantılı olduğu çeşitli araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Kashyap ve ark., 2018; Sakai ve ark., 2013; Seo ve Jeon, 2015). İnflamasyon endotoksinler, ROS seviyelerindeki değişiklikler, virüsler, yağ asitleri, hücrel redoks durumu, sitokinler, büyüme faktörleri ve kanserojenler gibi farklı uyaranlarla ortaya çıkabilir (Giampieri ve ark., 2018). Fizyolojik koşullarda yangı, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin patojenler ile çeşitli uyaranlara karşı koruyucu ve geçici tepkisidir. İnflamatuvar yanıtta sitokinler, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar veya IL-10 gibi antiinflamatuvar faktörler rol oynamaktadırlar. İnflamatuvar yanıtın merkezi düzenleyicisi, sitokin ve diğer inflamatuvar moleküllerin üretiminden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'dir (Joseph ve ark., 2014). NF- κ B, homo- ve heterodimerlerden (p65 veya RelA, p50/p105, c-Rel, p52/p100 ve RelB) oluşan transkripsiyonel bir faktördür. Nükleer faktör kappa B, I κ B inhibitör proteini ile hücrelerin sitoplazmasında inaktif olarak tutulur. I κ B protein ailesinin yedi üyesi tanımlanmıştır ve bunlar arasında I κ B α bulunmaktadır. Nükleer faktör kappa B'nin aktivasyonu üzerine I κ B α , I κ B kinazlar (IKK) tarafından fosforile edilir. Bu da NF- κ B'nin DNA'ya bağlandığı çekirdeğe doğru hızlı bir şekilde yer değiştirmesine izin veren I κ B'nin proteazom bağımlı bozunmasına yol açar. Etkinleştirilmiş en baskın NF- κ B dimeri p65:p50'dir. p65:p50'nin çekirdeğe translokasyonu, sitokinler (TNF- α , IL-1 β , IL-6) ve indüklenebilir enzimler (iNOS ve COX-2) gibi birkaç proinflamatuvar genin transkripsiyonu ile sonuçlanır (Heininger ve ark., 2000; Yoshimura, 2006).

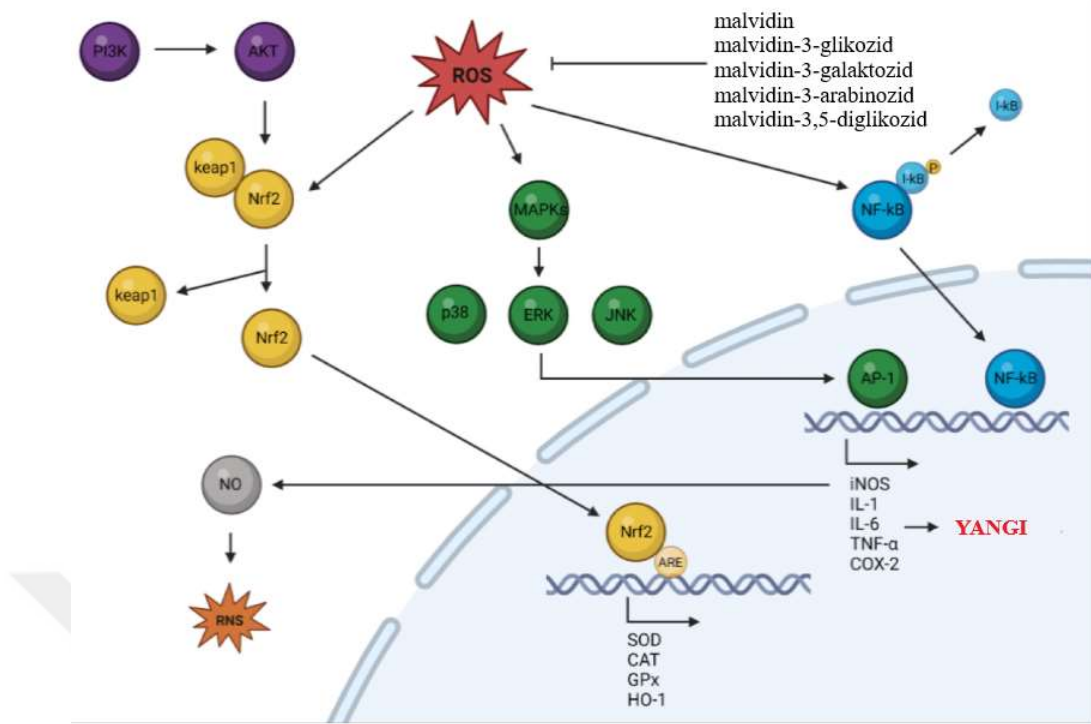
Siklooksijenaz-2 (COX-2), birçok inflamatuvar süreçte rol oynamaktadır. Bazı antioksidanlar, COX-2 genini düzenleyen sinyal mekanizmalarına müdahale ederek COX-2 ekspresyonunu inhibe eder. Araştırmalar, malvidin ve glikozidlerinin araşidonik asiti hedeflediğini ortaya koymuştur. Araşidonik asitten türeyen lipid aracı maddeler, COX-2 aracılığıyla üretilen prostaglandinler ve lipojenazlar (LOX) aracılığıyla lökotrienler gibi önemli antosiyanin hedefleridir. Siklooksijenaz enzimleri, araşidonik asidin prostanoidlere dönüşümü için gereklidir ve inflamasyonda önemli bir rol oynar. Lipojenazlar, araşidonik asidi bir substrat olarak kullanır ve 5S, 12R,

12S veya 15S oksijenasyonu olmak üzere dört farklı reaksiyonu katalize eder. Bu enzimlerin oksijenlenmiş substratları biyolojik tepkimeleri başlatır, hücrel sinyalleme için yüzey reseptörleri aracılığıyla aktive eder veya güçlü lipid aracı maddelere metabolize edilir (Merecz-Sadowska ve ark., 2023).

Nükleer faktör kappa B, sinyal yolunun, sinoviyal membran inflamasyonu ve eklem kıkırdak yıkımıyla ilişkilendirilen TNF- α , IL-1 β ve IL-6 dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu tetikleyerek, inflamatuvar yanıtlarda ve osteoartrit (OA) ilerlemesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca NF- κ B sinyal yolu tarafından indüklenen proinflamatuvar sitokinler, eklem kıkırdak yıkımı ve OA progresyonundan sorumlu olan matriks metaloproteinazların (MMP'ler) üretimini artırabilmektedir (Oeckinghaus ve Ghosh, 2009). Matriks metaloproteinazlar proteolitik enzimlerdir ve MMP-3, MMP-9 ve MMP-13'ün OA kıkırdaktaki kolajenlerin degradasyonunda önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Dai ve ark. (2017), sıçanlarda monosodyum iyodoasetat ile indüklenen OA üzerine malvidinin ağrı giderici ve antiinflamatuvar etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar malvidinin, kıkırdak dokularında monosodyum iyodoasetat tarafından indüklenen IL-1 β , IL-6, TNF- α ve MMP'lerin artan ekspresyonlarını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca malvidinin *in vitro* olarak p65'in çekirdeğe taşınmasını baskılayarak I κ B α 'dan bağımsız bir şekilde NF- κ B yolunu inhibe ettiğini de bildirmişlerdir.

İnflamasyonun diğer önemli araçları, TLR ve MAPK'dır (Giampieri ve ark., 2018). Meyvelerde bulunan antosiyaninlerin bu araçları inhibe etmek suretiyle antiinflamatuvar etki gösterdikleri bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda da yangıda önemli rol oynadıkları tespit edilmiştir (Giampieri ve ark., 2018; Jiang ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2013). Yüksek yağlı bir diyet, lipopolisakkaritin bağırsak bariyerinden emilimini ve gastrointestinal mukozanın geçirgenliğini artırmaktadır (Manco ve ark., 2010). Bu bağlamda hayvan modellerinde yapılan birçok çalışmada gösterildiği gibi lipopolisakkarit (LPS), zengin yağlı diyet ve tip 2 diyabetin neden olduğu obezitenin başlangıcında doğrudan rol oynayan önemli bir faktör olarak kabul edilebilir (Laugerette ve ark., 2012; Mani ve ark., 2013; Manco ve ark., 2010).

Malvidin ve glikozidlerinin antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerine ilişkin bulgular, oksidatif stresi ve inflamasyonu hafifletme potansiyellerinin olası moleküler mekanizmalarından kaynaklandığına dair kanıtlar sunmaktadır (Merecz-Sadowska ve ark., 2023) (Şekil 2.8). Malvidin ve glikozidleri üzerine yapılan araştırmalar, bu moleküllerin serbest radikalleri ve anyonları temizleme gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla antioksidan olarak işlev görebildiğini göstermektedir. Ayrıca, bu moleküllerin nükleer faktör eritroid 2 ile ilgili faktör (Nrf2) yolunu aktive edebildiği bulunmuştur. Bu yol, oksidatif stres duyarlı bir biçimde Nrf2'nin normalde aktin proteini Kelch benzeri ECH'ye bağlı protein-1 (Keap1)'e bağlı olduğu bir transkripsiyon faktörüdür. Ancak ROS'a maruz kalma, Nrf2'nin *ubikitin proteaz* yoluyla parçalanmasına yol açar. Bununla birlikte, malvidin ve glikozidleri Nrf2'yi stabilize ederek, nükleusta birikmesine ve antioksidan yanıt elementi (ARE) tarafından düzenlenen hedef genleri etkinleştirmesine olanak tanımaktadır. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilgili faktör, GST ve GPx, hemoksijenaz-1 (HO-1), CAT ve SOD gibi enzimleri arttırarak endojen antioksidan savunmayı düzenlemede önemli bir rol oynar. Keap1-Nrf2 sistemi, antioksidan enzim ekspresyonunu artırarak ROS'un neden olduğu oksidatif hasara karşı hücrel bileşenleri korumaya yardımcı olurken, oksidatif stresle ilişkili inflamatuvar reaksiyonlara duyarlılığı azaltmaktadır (Ma ve ark., 2013; Saha ve ark., 2020). Ayrıca, Nrf2, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üretimine yol açarak pentoz fosfat yolunun (PPP) aktivasyonunu teşvik eder, bu da indirgenmiş GSH disülfitten GSH'yi yeniden oluşturmak ve hücrel antioksidan seviyelerini korumakla ilişkilidir. Bu nedenle, Nrf2 indüksiyon verimliliğinin artırılması, malvidin ve glikozidlerinin antioksidan etkinliği için homeostatik mekanizmalar sağlamaktadır (Tribble ve Jones, 1990).



Şekil 2.8. Malvidin ve glikozidlerinin antiinflamatuvar ve antioksidan mekanizmaları (Merecz-Sadowska ve ark., 2023).

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) fenolik asitler, stilbenler (resveratrol), antosiyaninler ve proantosiyanidinler olmak üzere fitokimyasallar açısından zengin bir meyvedir (Afrin ve ark., 2016; Zunino ve ark., 2014). Üzümün ve farklı özütünün LPS kaynaklı strese karşı etkinliği, farklı *in vitro* ve *in vivo* modellerde araştırılmıştır (Bak ve ark., 2013; Gil-Cardoso ve ark., 2019; Jiang ve ark., 2017; Kim ve ark., 2018; Pallares ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2013). Üzüm çekirdeği prosiyanidin özütü (GSPE), RAW makrofajlarında LPS ile indüklenen inflamatuvar stresi, proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu, NO üretimini, NF-κB ve MAPK sinyal yolu aktivasyonunu etkili bir şekilde engellediği vurgulanmıştır (Bak ve ark., 2013). Makrofajlarda ve mikroglia hücrelerinde GSPE, LPS kaynaklı strese karşı koruyucu etki gösterdiği ve LPS'nin neden olduğu TLR-4 aktivasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2018). Benzer sonuçlar, LPS ile indüklenen sıçan Kupffer hücrelerinde ve insan yumurtalık kanseri hücrelerinde GSPE'nin, protein kinaz B (AKT)/NF-κB ve MAPK/ERK yollarını engellediği vurgulanmıştır (Jiang ve ark., 2017; Zhao ve ark., 2013). Ayrıca yapılan başka çalışmalarda sıçanlara çeşitli dozlarda uygulanan GSPE'nin, iNOS ekspresyonu ile yangısal sitokin üretimini inhibe ederek LPS kaynaklı yangıyı etkili

bir şekilde azalttığı belirtilmiştir (Gil-Cardoso ve ark., 2019; Pallares ve ark., 2013). Decendit ve ark. (2013), saflaştırılmış üzümde elde edilen bileşik olan malvidin-3-O- β glukozitinin (Mal β g), hücrelerin hayatta kalma, proliferasyon ve makrofajların aktivasyonunu inhibe etme yeteneklerini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak araştırmışlardır. Araştırmacılar insan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) üzerine uyguladıkları Mal β g'nin, aktif makrofajlardan TNF α , IL-1, IL-6 ile NO salıverilmesini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca sıçan artrit modelinde Mal β g'nin makrofajların inflamatuvar yanıtını da inhibe ettiğini araştırmışlardır. Mal β g'nin, hem terapötik hem de önleyici seviyelerde artrit modelinde pençe skorlarını ve yangıyı önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Bu veriler doğrultusunda Mal β g'nin, *in vitro* ve *in vivo* olarak güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu bildirilmiştir.

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus* L. ve *Vaccinium corymbosum* L.), *Ericaceae* ailesine ait olan ve yüzyıllardır halk hekimliğinde kullanılan, zor büyüyen, keskin tadı olan bir meyvedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunmuş ve çeşitli patofizyolojik koşullar üzerinde koruyucu etkilere sahip olan antosiyaninlerin ve fenolik bileşiklerin kaynağı olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır (Afrin ve ark., 2016). Buna rağmen bugüne kadar bu meyvenin LPS aracılı inflamatuvar durumlarda rolünü araştıran çok az çalışma vardır. Yaban mersini özlerinin fare modellerinde, NO üretimini azaltarak ve yangıyı baskılayarak, LPS'nin neden olduğu karaciğer ve göz hasarlarını önlediği bildirilmiştir (Reyes-Farias ve ark., 2015; Xie ve ark., 2011). Ayrıca LPS uygulanan sıçan modelinde yaban mersini takviyesinin, renal glomerüler filtrasyon hızını artırdığı, damar direncini ve ROS üretimini düşürdüğü tespit edilmiştir (Nair ve ark., 2014). Yapılan başka bir çalışmada Nrf2 ve Nrf2 nakavt farelerinden izole edilen kemik iliğinden hazırlanan makrofajlarda yaban mersini antosiyanin özütlerinin NO üretimini ve iNOS, COX-2, TNF- α ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Garcia-Diaz ve ark., 2015; Gasparrini ve ark., 2021; Johnson ve ark., 2013; Kim, ve ark., 2014; Lee ve ark., 2017; Xu ve ark., 2016).

Vasküler inflamatuvar yanıtlar, ateroskleroz ve kanser dahil birçok hastalıkta rol oynayan endotel bozuklukların temelidir. Malvidinin (1,10,50 ve 100 μ M) endotel hücrelerinde inflamatuvar yanıtı düzenleme üzerindeki etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının araştırıldığı çalışmada TNF- α , monosit kemotaktik protein-1

(MCP-1), hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon protein molekülünü ve mRNA düzeylerini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Buna karşın malvidin uygulaması, TNF- α ile indüklenen MCP-1, ICAM-1 ve VCAM-1 artışlarını konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca malvidinin inhibitör kappa B alfa'nın (I κ B α) bozulmasını ve p65'in nükleer translokasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiği tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2014). Huang ve ark. (2018), *Vaccinium ashei*' de bulunan malvidin ve glikozidlerinin (Mv3-glc ve malvidin-3-galaktozid) TNF- α uygulanan endotel hücreleri üzerindeki koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar malvidin ve malvidin glikozidlerinin monosit kemotaktik protein-1, hücreler arası yapışma molekülü-1, vasküler hücre yapışma molekülü-1 ve anjiyotensin I-dönüştürücü enzim ekspresyonlarını inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca Bastin ve ark. (2020), malvidinin periferik kan mononükleer hücresi üzerinde LPS'nin neden olduğu inflamatuvar reaksiyonları önlemedeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar LPS ile indüklenen PBMC'lerde malvidin ön uygulamasının IL-6, TNF- α , IL-1 β , COX-2 ve mRNA ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca LPS kaynaklı yangıya karşı malvidinin, NO ve MDA düzeylerinde düşüşe, SOD ve GPx aktivitelerinde artışa yol açarak koruyucu etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

2.2.1.5. Malvidinin Antikanserojen Etkileri

Kanser, tanı ve tedavide modern terapötik ilerlemelere rağmen dünya çapında en önde gelen ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde kanser görülme sıklığının sürekli artmakta olduğu bildirilmiştir (Antika ve Dewi, 2020). Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması, morfolojik hücre transformasyonu, apoptozun düzenlenmesi, invazyon, anjiyogenez ve metastaz süreçlerini içeren bir hastalıktır (Bhui ve ark., 2009). Kanser görülme sıklığı teşhis araçlarında, tedavi yöntemlerinde ve kanser farkındalık programlarında ilerleme kaydedilse bile sürekli artmaya devam etmektedir. Akciğer, meme ve kolorektal kanserler en yaygın görülen kanser türleridir (Ferlay ve ark., 2015). Cerrahi operasyon, radyasyon tedavisi, immünoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi gibi farklı yöntemler kanserle mücadelede kullanılmaktadır (Kashyap ve ark., 2019). Bu tedavi yöntemleri kanser hücrelerini yok ederken sağlıklı hücrelere zarar vermekte ve canlı

vücudunda ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu olumsuz etki nedeniyle kanserin önlenmesi ve hastalığın tedavisi sırasında tedavinin sebep olduğu yan etkilerin en aza indirilmesi için çeşitli antioksidan maddelerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Gündoğdu ve Akbulut, 2019).

Kanser araştırmalarındaki gelişmeler, apoptozun gerçekleştirilmesi yoluyla kanser hücrelerinin kaçış davranışını durduran yeni ilaçların geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu bağlamda, mevcut ilaçların kombinasyonu ile yeni apoptotik indükleyiciler veya duyarlılaştırıcılar kullanılmıştır. Apoptozu tetikleyen yollardaki kusurlar sonuçta neoplastik hücrelerin çoğalmasına yol açabilir. Apoptoz direnci, sonuçta tümör oluşumuna yol açan anormal hücre çoğalmasını uyarır ve aktif kanser tedavisinin önünde önemli bir engel oluşturur (Plati ve ark. 2011). Kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi ve normal hücrelerin eş zamanlı ölümünün sınırlandırılması, kanser tedavisinin temel amacıdır (Gerl ve Vaux, 2005). Bazı proteinlerin hücrede pro- ve anti-apoptotik aktivite gösterdiği araştırılmıştır ve bu proteinlerin oranı hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Benzer şekilde kanser gen terapisi veya immünoterapide kanser apoptozunun indüklenmesi ana yaklaşımlar arasındadır. Apoptotik indükleyici, aracı veya yürütücü gen, endojen karşılığının eksikliğini tersine çevirmek için rutin olarak kanser hücrelerine dahil edilir. Kemoterapiye yanıt olarak apoptozu tetikleyen olaylar dizisinin ve apoptoz sürecinin işlevsizliğinin anlaşılması, kansere karşı moleküler hedefli spesifik tedavilerin geliştirilmesine yönelik yeni, etkili terapötik yaklaşıma yönelik fikir vermektedir (Aiuti ve ark., 2007).

Araştırmacılar antosiyaninlerin kanser hücrelerinde antioksidan enzim aktivitesini arttırırsa bunun kanser hücreleri için koruyucu bir etki olup olmayacağını veya apoptozu önleyip engellemeyeceğini ve dolayısıyla vücut için olumsuz bir etki olup olmayacağını belirlemenin önemli olacağını düşünmüşlerdir (Bagchi ve ark., 2004; Huang ve ark., 2006; Nagase ve ark., 1998). Antosiyanin özütleri anti-anjiyojenik etkileri ve çoklu kanser hücresi tiplerinde istilayı inhibe etme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Antosiyaninler, endotel hücreleri, insan oral skuamöz hücre karsinomu ve fare epidermal JB6 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır (Bagchi ve ark., 2004; Boateng ve ark., 2007; Huang ve ark., 2006; Nagase ve ark., 1998; Reen

ve ark., 2006). Huang ve ark. (2006), fare epidermal JB6 hücrelerine siyah ahududulardan elde ettikleri antosiyaninleri uygulamışlar ve fosfoinosit 3-kinaz (PI3K)/Akt/AP-1 yolağının inhibisyonu yoluyla vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve TNF- α ile indüklenen epidermal keratinositlerde antosiyaninlerin, VEGF ekspresyonunu inhibe ederek anjiyogenezi baskıladığı ve endotel hücrelerinde VEGF ve VEGF reseptör ekspresyonunu azaltarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (Nagase ve ark., 1998). Boateng ve ark. (2007), sıçanlarda azoksimetan ile kolon kanserini indüklemişler, daha sonra toplam diyetlerinin %5'ine yaban mersini uygulamışlardır ve sıçanların karaciğerlerinde GST aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Reen ve ark. (2006), sıçanların yemlerine %5 ve %10 kurutulmuş siyah ahududu ilave ettikleri benzer bir çalışmada GST aktivitesinde önemli bir artış tespit etmişlerdir. Antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artış hücreleri apoptozdan korumaktadır (Prior ve Wu, 2006; Shih ve ark., 2007). Shih ve ark. (2007), 50 $\mu\text{mol/L}$ düzeyinde 10 farklı antosiyaninin GST, GR, GPx aktiviteleri ile apoptoz üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar tüm antosiyaninlerin GST, GR, GPx aktivitelerini artırdıklarını ve apoptozu azalttığını belirtmişlerdir. Yaban mersini antosiyaninlerinden malvidinin *in vitro* olarak kolon kanseri modelinde araştırılmış ve malvidinin GST, GR ve GPx aktivitelerini kullanılan doza bağlı olarak artırdığı tespit edilmiştir (Prior ve Wu, 2006). Kolorektal karsinom, tüm dünyada en sık saptanan kanserlerden biridir. Terapötik ve cerrahi müdahalelerdeki ilerlemelere rağmen daha güvenli ve daha etkili terapötik modellerin araştırılmasına ihtiyaç vardır (Bagchi ve ark., 2004). Xu ve ark. (2018), malvidinin insan kolorektal HCT-116 kanserine ve FR-2 normal insan hücre hatlarına karşı antikanser aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, malvidinin, normal insan FR-2 hücre hattına karşı 65 μM 'lik maksimum inhibisyon konsantrasyonuna (IC_{50}) kıyasla kolorektal kanser HCT-116 hücre hattına karşı 15 μM 'lik bir IC_{50} sergilediğini ortaya koymuşlardır. Malvidinin, koloni oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve HTC-116 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini bildirmişlerdir. Malvidinin kolorektal kanser hücrelerine karşı önemli bir antikanser aktivite sergilediğini ve kanser kemoterapisinde önemli bir öncü molekül olduğunu belirtmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali

Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (16.03.2022/868-20.12.2023/1233) onayı doğrultusunda gerçekleştirildi. Araştırmada hayvan materyali olarak kullanılan fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Araştırmada yaklaşık 25-30 g ağırlığında 10-12 haftalık CD-1 cinsi erkek fare kullanıldı. Farelere maddeler uygulanmadan 1 hafta önce ortama adaptasyonları sağlandı. Bu araştırmada kontrol, fipronil, malvidin ve malvidin ile fipronilin birlikte verildiği olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta 12 adet olmak üzere toplam 48 adet erkek fare kullanıldı (Tablo 3.1). Grupların belirlenmesinde Basit Rasgele Örneklem Yöntemi ile Tek Körlü Deneme (Single Blind) Yöntemi kullanıldı. G-Power 3.1.9.7. program ile güç analizi yapıldı; alfa=0.05, güç=0.80, etki büyüklüğü=0.5 ve grup sayısı=4 değerleri için gerekli olan toplam örneklem sayısı 48 olarak bulundu. Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık siklusu ayarlanabilir odalarda uygun nem (%55-65 nem) ve sıcaklık (21-23 °C) koşullarında bakıldı. Tüm hayvanlara *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Deneme süresi boyunca hayvanlara %24 ham protein, %6,19 ham selüloz ve 3.100 kcal/kg metabolik enerji içeren fare pelet yemi kullanıldı.

Tablo 3.1. Araştırmada kullanılan hayvan gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler (n:12).

Deney Grupları	Verilen maddeler-Verildiği günler
Kontrol	% 0,1'lik DMSO içeren fizyolojik NaCl gavajla -14 gün
FPN	5 mg/kg/c.a/gün fipronil gavajla -14 gün
MLV	5 mg/kg/c.a/gün malvidin hidroklorür (% 0,1'lik DMSO içeren fizyolojik NaCl içinde çözdürüldü) gavajla -14 gün
MLV+FPN	Malvidin hidroklorür (5 mg/kg/c.a/gün gavajla), fipronil (5 mg/kg/c.a/gün gavajla) uygulamasından 2 saat önce verildi -14 gün
FPN: Fipronil	MLV: Malvidin MLV+FPN: Malvidin+Fipronil

Hayvanlara verilecek fipronilin dozu Elshony ve ark. (2021); malvidin dozu ise Fagundes ve ark. (2021) yaptıkları araştırmalardan yararlanılarak belirlendi. Proje önerisinde fipronilin 10 mg/kg c.a dozunda kullanılacağı belirtilmişti fakat yapılan ön çalışma sonucunda hayvanlar üzerinde aşırı toksik etkiden/ölümden dolayı literatür bilgileri doğrultusunda doz değişikliği yapılmıştır. Malvidin %0,1'lik dimetil sülfoksit (DMSO) içeren fizyolojik NaCl içinde çözündürülmüştür. Fipronil için ticari preparat kullanılmıştır. Çalışma 15. günde sonlandırıldı. Hayvanların tamamı ketamin (90 mg/kg periton içi) ve ksilazin (10 mg/kg periton içi) ile anesteziye alınarak kalpten kan alma işlemi gerçekleştirildi ve hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Kan ve doku (karaciğer, böbrek ve beyin) örnekleri alındı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Araştırmada kullanılan cihaz ve gereçler Tablo 3.2'de, kimyasallar da Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.2. Araştırmada kullanılan cihaz ve gereçler.

Kullanılan Cihaz/Gereç	Marka ve Kodu
ELISA okuyucu	ELx800-Biotek
Hassas terazi	Shimadzu-BX 4200H
Homojenizatör	IKA-T18 digital ULTRA TURRAX
Işık mikroskobu	Olympus-CX21
Kamera	Olympus-DP26
Magnetik karıştırıcı	IKA-RH Basic 2
Mikrotom	Leica-2155 rotary
Otoanalizör	GesanChem-200
Ototeknikon	Leica-SP300S
pH metre	Metrohm-704
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf-5810R
Vorteks	Yellowline-TTS2

Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasallar	Marka ve Kodu
8-hidroksideoksiguanozin ELISA kiti	BLS-7861Ge-Bostonchem
Bakır sülfat	Aldrich-451657
Dimetil sülfoksit	Tekkim-201790.01000
Dipotasyum fosfat	Merck-1551128
Disodyum hidrojen fosfat	Merck-106580
Fipronil	Fiprovat
Glutasyon ELISA kiti	BLS-8571Mo-Bostonchem
Glutasyon peroksidaz 1 ELISA kiti	BLS-2688Mo-Bostonchem
İndüklenebilir nitrik oksit sentaz 2 ELISA kiti	BLS-1504Mo-Bostonchem
İnterlökin 1 β ELISA kiti	BLS-1271Mo-Bostonchem
Katalaz ELISA kiti	BLS-6301Mo-Bostonchem
Ketamin	Vetaketam
Ksilazin	Vetaxyl
Malondialdehid ELISA kiti	BLS-8658Mo-Bostonchem
Malvidin	Cayman-19752
Nükleer Faktör Kappa B2 ELISA kiti	BLS-2209Mo-Bostonchem
Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlgili Faktör-2 ELISA kiti	BLS-8104Mo-Bostonchem
Potasyum sodyum tartarat	Merck 108087
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 104873
Siklooksijenaz 2 ELISA kiti	BLS-7630Mo-Bostonchem
Sodyum klorür	Merck-106400
Sodyum hidroksit	Merck 106482
Sodyum bikarbonat	Merck-1613655
Süperoksit dismutaz ELISA kiti	BLS-8749Mo-Bostonchem
Tümör nekroz faktör α ELISA kiti	BLS-1387Mo-Bostonchem

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kan ve Doku Analizleri

Kanlar direkt olarak tüplere alındı ve 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek; serum AST, ALT, kreatinin ve BUN değerleri otoanalizör ile ölçüldü.

3.2.2. Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularının Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması

Dokular öncelikli olarak % 0,9'luk tuzlu su ile yıkandı. Sonra dokular kitlerde belirtilen 0,01 M pH: 7.4 fosfat tampon çözeltisi (1 g doku/9 ml PBS, 1:10 sulandırıldı) ile homojenize edildi. Homojenat daha sonra 15000 devirde 45 dakika (4°C) santrifüj

edilerek süpernatantlar elde edildi. Örnekler analizleri yapılncaya kadar -20 °C’de saklandı.

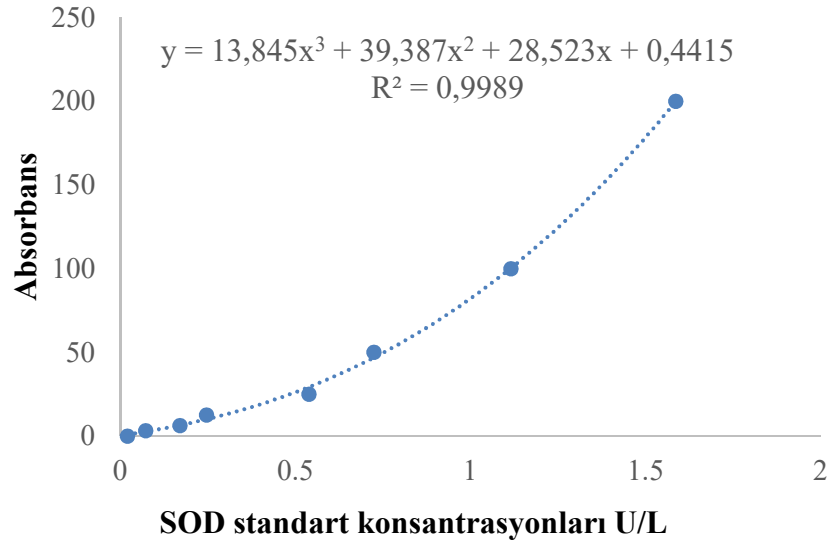
Doku homojenat örneklerinde SOD, CAT, GPx1, iNOS2, COX-2 ve TNF- α etkinliği ile GSH, MDA, Nrf2, NF- κ B2, IL-1 β ve 8-OHdG düzeyleri ölçüldü.

3.2.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki SOD etkinliği ticari kit (BLS-8749Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 1,39 U/L’dir. Tespit edilebilir aralığı ise 3,13-200 U/L’dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Dilüsyon için toplamda 7 tüp kullanıldı.
- Her bir tüpe 500 μ l standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (200 U/L) 1. tüpe 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (100 U/L).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (50 U/L).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (25 U/L).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (12,5 U/L).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (6,25 U/L).
- 6.tüpe 5. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (3,13 U/L).



Şekil 3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) standart grafiği.

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi. Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.1). Ölçülen SOD etkinliği homojenat örneklerinde U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.4. Katalaz (CAT) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki CAT etkinliği ticari kit (BLS-6301Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı.

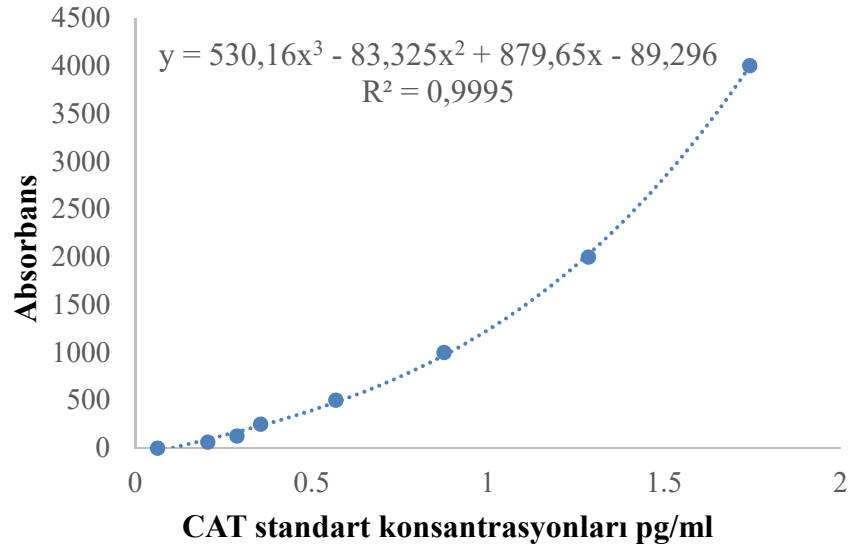
Yöntemin duyarlılığı 25,7 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 62,5-4000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Dilüsyon için toplamda 7 tüp kullanıldı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (4000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (2000 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1000 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm'de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.2). Ölçülen CAT etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.2. Katalaz (CAT) standart grafiği.

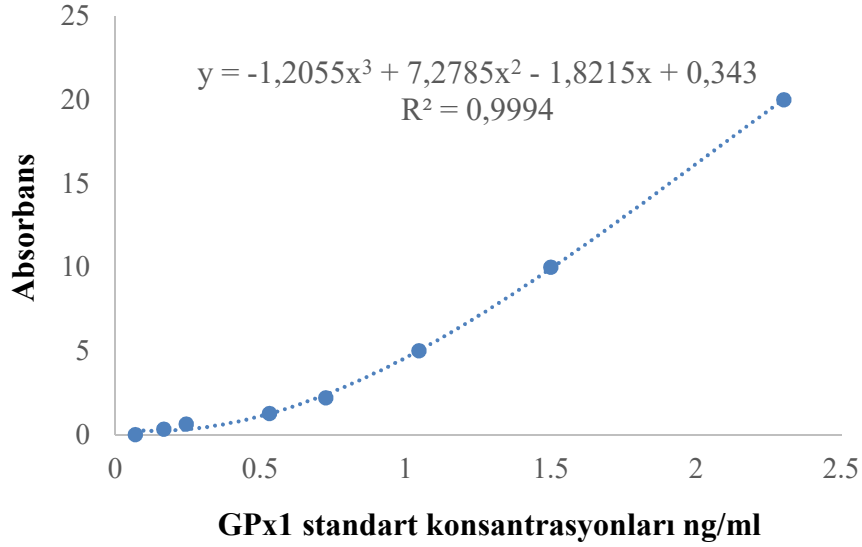
3.2.5. Glutasyon Peroksidaz 1 (GPx1) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki GPx1 etkinliği ticari kit (BLS-2688Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,132 ng/ml'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,32-20 ng/ml'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (20 ng/ml) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (10 ng/ml).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (5 ng/ml).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (2,5 ng/ml).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,25 ng/ml).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,63 ng/ml).
- 6.tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,32 ng/ml).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



Şekil 3.3. Glutatyon peroksidaz 1 (GPx1) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.3). Ölçülen GPx1 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.6. İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz 2 (iNOS2) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki iNOS2 etkinliği ticari kit (BLS-1504Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,116 ng/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,32-20 ng/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

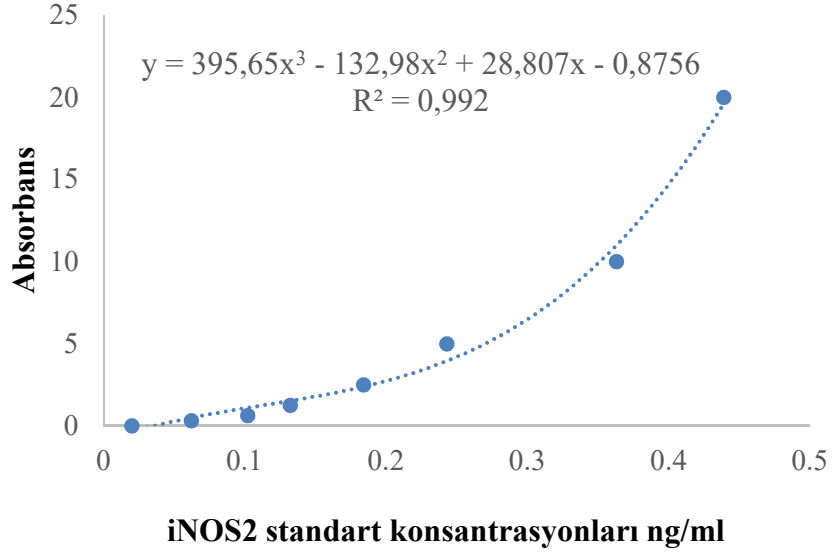
Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (20 ng/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (10 ng/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (5 ng/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (2,5 ng/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,25 ng/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,63 ng/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,32 ng/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm'de

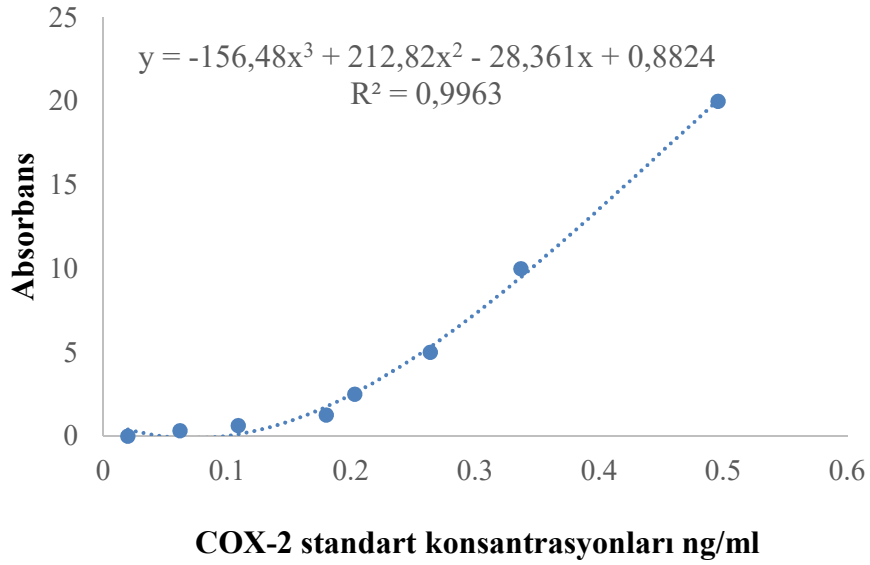
okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.4). Ölçülen iNOS2 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.4. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz 2 (iNOS2) standart grafiği.

3.2.7. Siklooksijenaz 2 (COX-2) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki COX-2 etkinliği ticari kit (BLS-7630Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,114 ng/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,32-20 ng/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).



Şekil 3.5. Siklooksijenaz 2 (COX-2) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.5). Ölçülen COX-2 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.8. Tümör Nekroz Faktör α (TNF-α) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki TNF-α etkinliği ticari kit (BLS-1387Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre

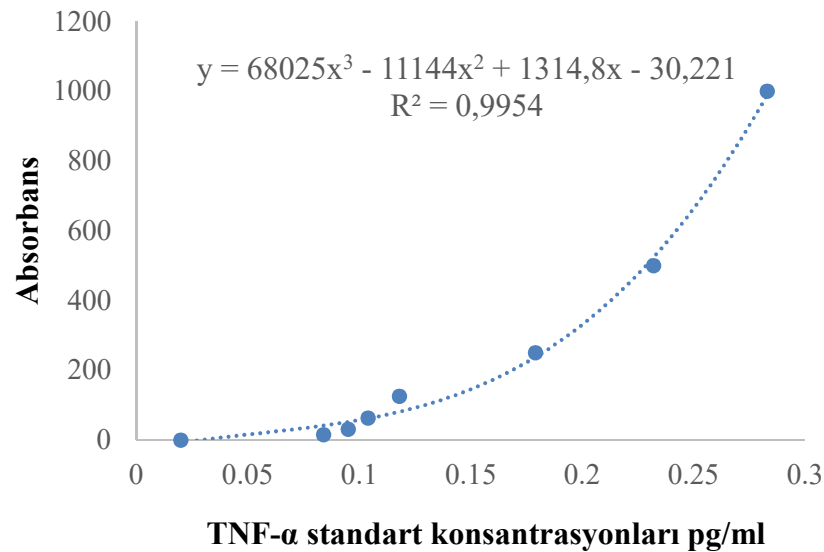
yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 6,1 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL'dir.

Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



Şekil 3.6. Tümör nekroz faktör-α (TNF-α) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyde 100 µl ilave edildi. Mikropleyde üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleydeki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleyde üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleydeki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleyde üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleydeki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.6). Ölçülen TNF-α etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

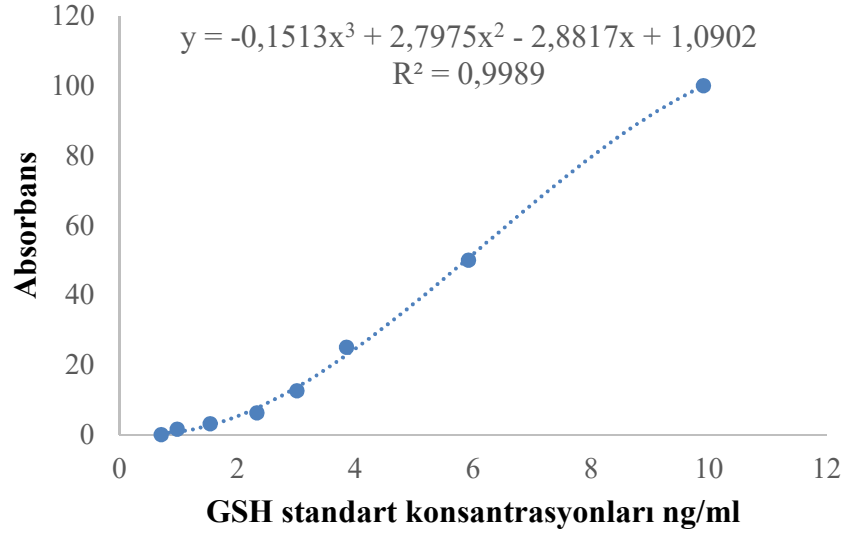
3.2.9. Glutasyon (GSH) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki GSH etkinliği ticari kit (BLS-8571Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,48 ng/mL’dir. Tespit edilebilir aralığı ise 1,57-100 ng/mL’dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (100 ng/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (50 ng/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (25 ng/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (12,5 ng/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (6,25 ng/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (3,13 ng/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,57 ng/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



Şekil 3.7. Glutatyon (GSH) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.7). Ölçülen GSH etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.10. Malondialdehid (MDA) Analizi

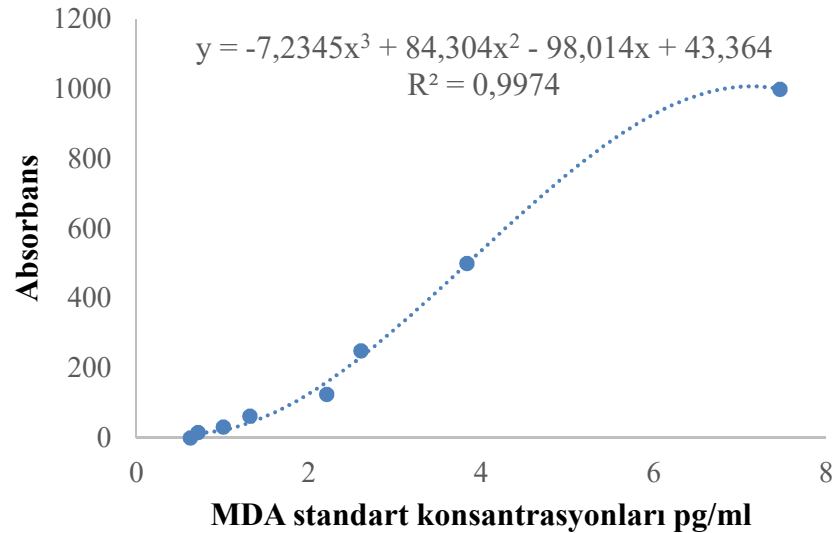
Doku homojenat örneklerindeki MDA düzeyi ticari kit (BLS-8658 Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı.

Yöntemin duyarlılığı 5,39 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



Şekil 3.8. Malondialdehid (MDA) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyde 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleyde üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleydeki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleyde üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleydeki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.8). Ölçülen MDA düzeyi homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

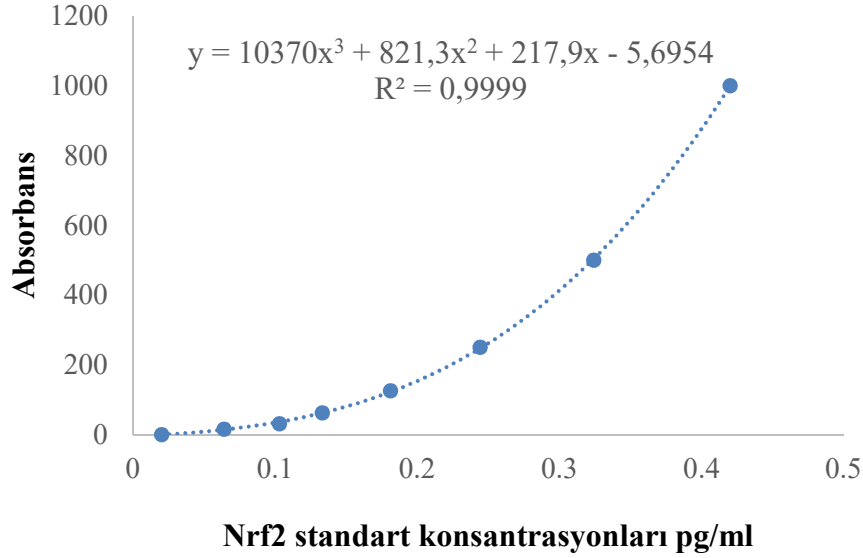
3.2.11. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlgili Faktör 2 (Nrf2) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki Nrf2 etkinliği ticari kit (BLS-8104Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 5,7 pg/mL’dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL’dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6.tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



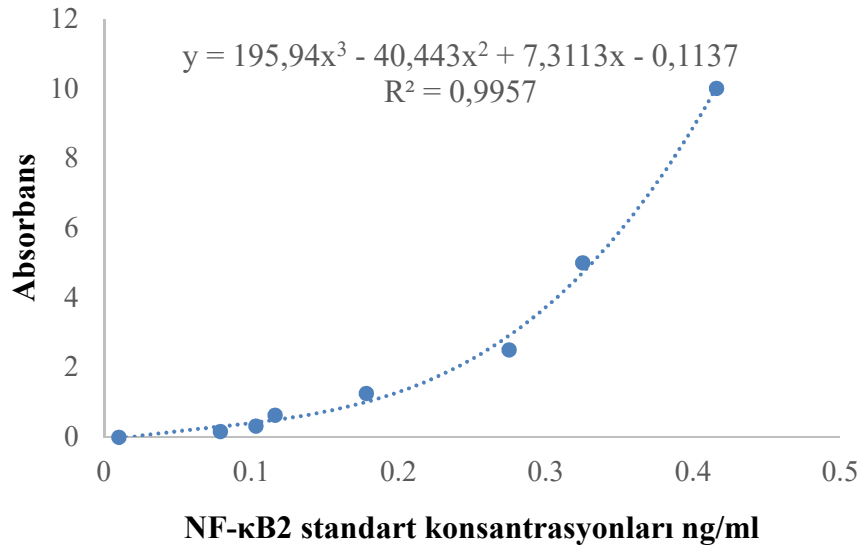
Şekil 3.9. Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlgili Faktör 2 (Nrf2) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.9). Ölçülen Nrf2 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.12. Nükleer Faktör Kappa B2 (NF-κB2) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki NF-κB2 etkinliği ticari kit (BLS-2209Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,057 ng/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,16-10 ng/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su). Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (10 ng/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (5 ng/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (2,5 ng/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,25 ng/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,63 ng/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,32 ng/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,16 ng/mL).



Şekil 3.10. Nükleer Faktör Kappa B2 (NF-κB2) standart grafiği.

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.10). Ölçülen NF-κB2 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.13. İnterlökin 1 β (IL-1β) Analizi

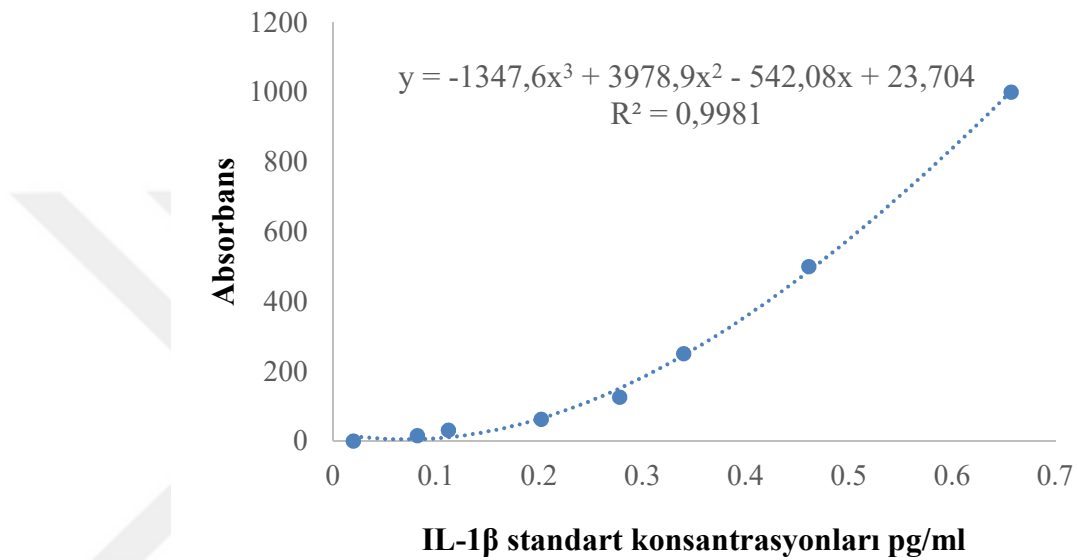
Doku homojenat örneklerindeki IL-1β düzeyi ticari kit (BLS-1271Mo ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 6,4 pg/mL’dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL’dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).

- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6.tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.



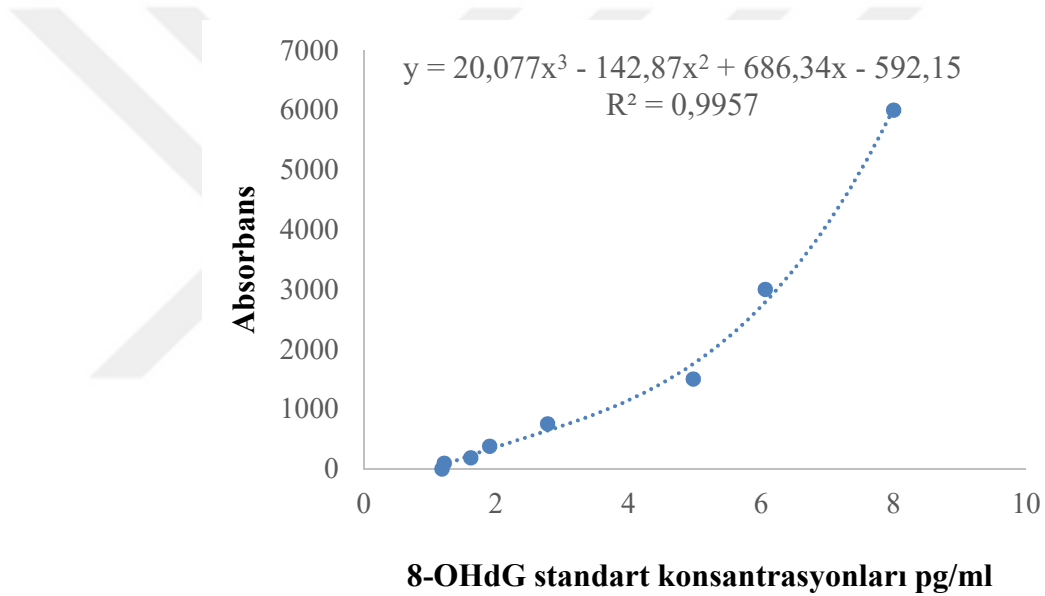
Şekil 3.11. İnterlökin 1β (IL-1β) standart grafiği.

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 °C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon

değerleri hesaplandı (Şekil 3.11). Ölçülen IL-1 β etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.14. 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki 8-OHdG düzeyi ticari kit (BLS-7861Ge ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 26,29 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 93,75-6000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).



Şekil 3.12. 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) standart grafiği.

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 μ l standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (6000 pg/mL) 1. tüpe 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (3000 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (1500 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (750 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (375 pg/mL).

- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (187,5 pg/mL).
- 6.tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (93,75 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi. Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleyttteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleyttteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.12). Ölçülen 8-OHdG düzeyi homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.15. Dokulardaki Total Protein Yoğunluğu

Dokulardaki total protein yoğunluğu Gornal ve ark. (1949) bildirdiği Biüret metoduna göre yapıldı. Yöntemin prensibi Biüret ayracında bulunan Cu^{+2} nin proteinlerin yapısındaki azot atomları ile mavi renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 540 nm’de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Analizde 1 ml homojenat üzerine (kör için 1 ml su üzerine) 4 ml Biüret ayracı (Na-K tartarat+ CuSO_4) karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve absorbans 540 nm’de spektrofotometrede okundu. Dokulardaki total protein miktarı mg/ml olarak ifade edildi.

3.2.16. Histopatoloji Yöntemi

Araştırmanın histopatolojik değerlendirme aşaması Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda tüm fareler derin anestezi altında ötenazi edildi. Nekropsi sırasında

toplanan karaciğer, böbrek ve beyin dokusu örnekleri solüsyonun içlerine daha iyi penetre olması için küçük parçalara ayrılarak %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna atılarak tespit edildi. Solüsyonları her gün değiştirilen örnekler 2 gün boyunca formaldehit içinde bekletildi. Sertleşen örnekler bu süre sonunda daha küçük parçalara ayrılarak trimleme işlemleri yapıldı ve doku takip kasetleri içerisine yerleştirildi. Kasetler içinde 1 gün daha tespit solüsyonuna alınan örnekler gece boyunca rutin histolojik doku takibinden geçirilmek için akşam üzeri Leica ASP300S model tam otomatik doku takip cihazına (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirildi. Böylelikle doku örnekleri tüm gece boyunca cihazda rutin doku takip prosedüründen geçirildi. Doku takibi için örnekler düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere doğru derecesi artan alkol solüsyonlarından geçirilerek dokuda bulunan suların alınması gerçekleştirildi. Bu şekilde örneklerin dehidre olmaları sağlandı. Bu aşamayı takiben tüm örnekler 2 ayrı ksilol serisinden geçirilerek dokulardaki yağların eritilmesi sağlandı. Su ve yağları alınan ve içlerinde boşluklar şekillenen bölgelere sıcak parafinin yerleşmesi ve dokuya sertlik kazandırması için doku örnekleri 56°C de eritilmiş sıcak parafin içerisine konuldu. Ertesi gün doku takip işlemleri tamamlanan doku örnekleri parafin içine gömülerek blokaj aşamaları tamamlandı. Blokaj aşaması için doku takip süreci tamamlanmış olan örnekler doku takip cihazından çıkarılarak doku gömme cihazına (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) transfer edildi ve burada parafine blokajları yapıldı. Blokaj işlemleri tamamlanan parafin bloklar doku gömme ünitesinin soğuk tablalı bölümüne alındı. Bu alanda 1-2 saat kadar bekletilen blokların parafinin tamamen donması ve sertleşmesi sağlandı. Oluşturulan her bir parafin bloktan hem Hematoksilen-eozin (HE) boyaması hem de immunohistokimyasal boyamalar amacıyla Leica 2155 model rotary mikrotom ile (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Sıcak su içinde benmaride açılması sağlanan kesitler lamaların üzerine alınarak kurutuldu. Hematoksilen-eozin boyaması için lamlara çekilen kesitler etüve alınarak 2 saat süreyle 60°C'de bekletildi ve hem kesitlerdeki parafinin erimesi hem de tamamen kuruyarak lam üzerine yapışması sağlandı. Bu aşamadan sonra kesitlerde bulunması muhtemel olan parafin artıklarının tamamen uzaklaştırılması amacıyla tüm preparatlar 30'ar dakikalık sürelerle 3 ayrı ksilol serisinde bekletildi. Bu işlemten sonra %100'lük alkollerden başlayarak

%70'lik alkollere doğru sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirilerek dokulara su verilmesi ve kesitlerin rehidre olması sağlandı. Rehidrasyonları tamamlanan kesitler Harris hematoksilen ile 10-15 dakikalık süre ile boyandı ve su ile yıkanarak fazla boyalar atıldı. Yıkamanın hemen ardından eozinde 3-5 dakika kadar boyandı ve rutin hematoksilen-eozin (HE) boyama prosedürü tamamlandı. Boyamanın ardından doku kesitleri sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilerek son olarak tekrar dehidrasyonları sağlandı. Bu işlemin ardından ksilol ile parlatılan kesitlerin üzerine entellan damlatılarak lamel kapatıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Beyin, karaciğer ve böbreklerdeki histopatolojik değişiklikler 0-3 arasında Tablo 3.4.'te verilen kriterlere göre skorlandı.

Tablo 3.4. Histopatolojik skortlama kriterleri

Organ	0	1	2	3
Beyin	Normal	Şiddetli hiperemi ve mikro kanamalar	Belirgin kanama ve nöronlarda dejenerasyon	Şiddetli kanama ve nöronal nekrozlar
Karaciğer	Normal	<%5 alanda yağlanma, hafif infiltrasyon	%6-20 alanda yağlanma, orta derecede infiltrasyon, hücrelerde dejenerasyonlar	>%21 alanda yağlanma, şiddetli infiltrasyonlar, nekrotik alanlar
Böbrek	Normal	<%5 alanda tubul epitellerinde dökülme, belirgin hiperemi ve hafif infiltrasyonlar	%6-20 alanda tubul epitellerinde dökülme, mikro kanamalar ve orta şiddetle infiltrasyonlar	>%21 alanda tubul epitellerinde dökülme, şiddetli kanamalar ve şiddetli infiltrasyonlar

3.2.17. İmmunohistokimya Yöntemi

İmmunohistokimyasal incelemeler için yukarıda açıklanan işlemlerden geçirilerek hazırlanan parafin bloklardan alınan kesitler poli-L-lizinli lamalara çekilerek streptoavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle boyanmaları sağlandı. İmmunohistokimyasal inceleme için caspase-3 (Anti-Caspase-3 p12 antibody [EPR16888] (ab179517) (Abcam, Cambridge, UK), caspase-9 (Anti-Caspase-9 p35 antibody (ab210611) (Abcam, Cambridge, UK), Bax (Rabbit polyclonal Anti-Bax antibody (bs0127R)) (Bios Antibody, MA, USA) ve Bcl-2 (Rabbit polyclonal Anti-

Bcl-2 antibody (bs0032R) (Bios Antibody, MA, USA) primer antikorları kullanıldı. Tüm primer antikorlar 1/100 oranında antikor sulandırma solüsyonları ile sulandırılarak kullanıldı. İmmunohistokimyasal yöntem için kesitler histopatoloji yönteminde açıklandığı şekilde ksilol serileri ile dereceleri azalan alkol serilerinde bekletilerek deparafinizasyon ve rehidrasyon aşamaları tamamlandı. Bu aşamaların ardından bütün kesitler 10 dakika süreyle distile su içinde bekletildi ve takiben dokular içindeki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanol ile %3 oranında hazırlanmış hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemin ardından boya yoğunluğunu belirginleştirmek için sitrat tampon solüsyonu içinde mikrodalga fırında 700'lük ayarda 2 defa 5 dakika süreyle kaynatıldı. Ardından tüm kesitler 2 defa 10'ar dakika süreler ile PBS içinde bekletilerek yıkandı. Dokulardaki spesifik olmayan bağlanma ve boyanmaları önlemek amacıyla normal serumda 15 dakikalık süreyle inkübe edildi. Bu aşamadan sonra yıkama işlemi yapılmadan serumun fazlası atılarak birer seri kesit primer serumlarla ayrı ayrı inkübe edildi. Bu inkübasyonlar +4 °C'de bir gece boyunca buzdolabı içinde bırakılarak gerçekleştirildi. Ardından buzdolabından alınan kesitler 2 defa 10'ar dakikalık süreler ile PBS içinde yıkandı. Bu aşama da tamamlandıktan sonra kesitler üzerine streptoavidin damlatılarak 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İmmunohistokimyasal boyama işleminin hiçbir aşamasında kesitlerin kurummasına izin verilmeden işlemler nemli kamaralar içinde gerçekleştirildi ve aralarda PBS ile 2 defa 10'ar dakikalık süreler ile yıkamaları gerçekleştirildi. Bu aşama tamamlandığında kesitlere biyotinli serum damlatılarak 30 dakika süreyle inkübe edildi. Ardından tüm kesitler PBS ile yukarıda açıklanan şekilde ve süreler ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra reaksiyonun görünür hale gelmesini sağlamak amacıyla yeni hazırlanan DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojen solüsyonu ile boyamaları yapıldı. Sekonder kit olarak Abcam firmasının kullanıma hazır Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection Kit –Micropolymer (ab236466) kiti kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama aşaması tamamlanan kesitlere Harris hematoksisilenle karşıt boyama yapıldı. Böylelikle boyanma aşamaları biten kesitler alkollerden geçirilerek dehidre edildi, ksilolden geçirilerek parlatıldı ve üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Bir gün kadar kurutulan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Negatif kontroller için ise kesitlere primer antikor aşamasında onların yerine antikor sulandırma sıvıları

damlatıldı ve diğer aşamalar anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal olarak pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayımları gerçekleştirilerek pozitif hücre yüzdesi hesaplandı ve gruplar arasında istatistik olarak değerlendirmeler yapıldı. Bu amaçla 40X objektif altında her preparattan rastgele 5'er alan belirlendi ve 20'şer hücre sayılarak toplamda 100 hücre sayıldı. İmmunohistokimyasal markırları ekspres eden pozitif hücrelerin sayılarının tespiti için Image J 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda MD) programından yararlanıldı. Sadece belirgin olarak kahverengi olan hücreler pozitif kabul edildi. Programda değişik renkler seçilerek fotoğraf üzerindeki hücrelere tıklandı ve işaretlemeler yapıldı. Sonuçların fotoğraflanması için Olympus CX41 model mikroskop ile morfometrik inceleme ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

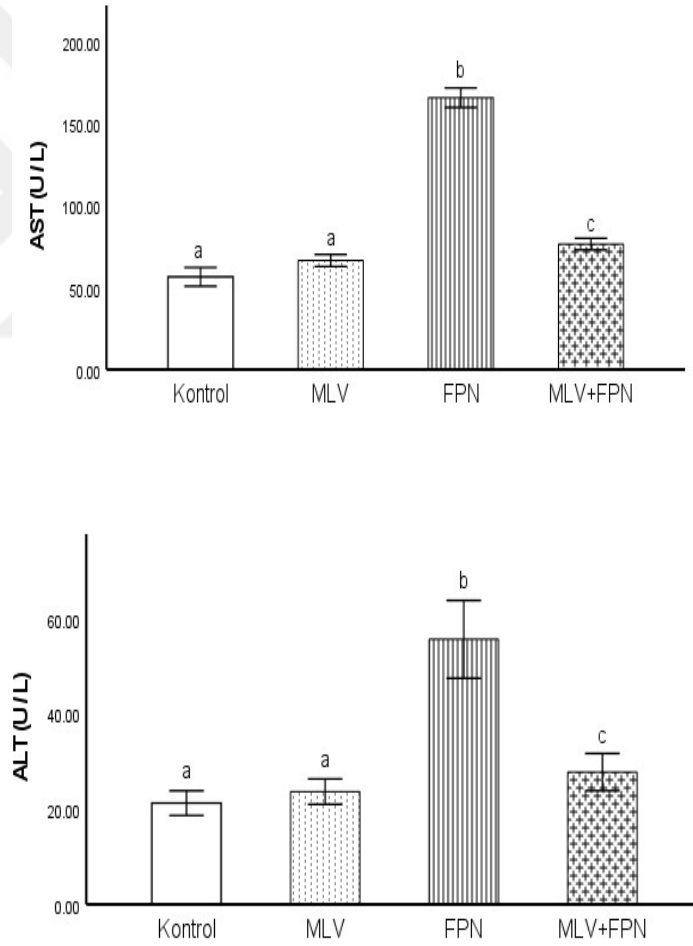
3.2.18. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS 22 programı ile değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SE) ile ifade edildi. Elde edilen verilerin öncelikli olarak Shapiro Wilk testi ile parametrik-nonparametrik olup olmadıkları analiz edildi. Histopatolojik skorlama verilerinin nonparametrik, diğer tüm verilerin parametrik dağılım gösterdiği belirlendi. Biyokimyasal parametreler, antioksidan-oksidatif stres, antiinflamatuvar-inflamatuvar parametreleri ve transkripsiyon faktör düzeylerinin istatistiksel analizi One-Way ANOVA ile yapıldı ve gruplar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. $p < 0,05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi. Histopatolojik skorlamalar normal dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis testi ve Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0,05$ olan değerler istatistik açıdan önemli olarak kabul edildi. İmmunohistokimyasal olarak pozitif hücre yüzdelерinin istatistik analizinde gruplar arası farkların belirlenmesinde Duncan testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistik açıdan önemli olarak kabul edildi.

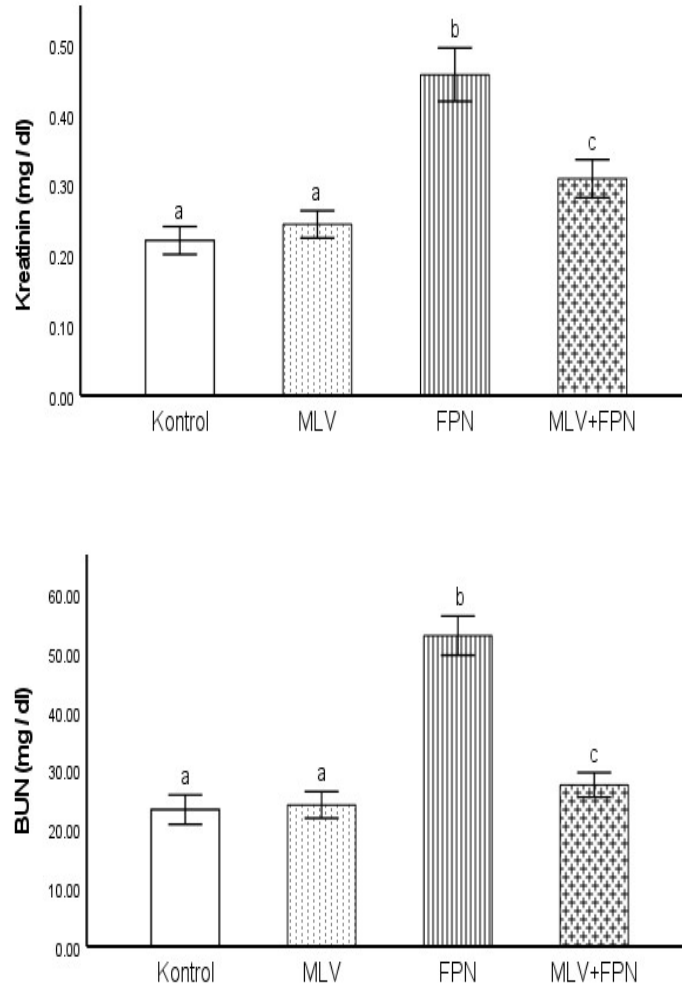
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

Fipronil verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT, kreatinin ve BUN değerlerinde önemli düzeyde artış ($p<0,05$) tespit edildi. Malvidin ve fipronilin birlikte verildiği grupta ise fipronilin tek başına verildiğinde artan AST, ALT, kreatinin ve BUN değerlerinde önemli düzeyde düşüş ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Tek başına malvidin verilen grupta değerler kontrol grubuna benzer düzeylerdeydi (Tablo 4.1; Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer fonksiyonları üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek fonksiyonları üzerine etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

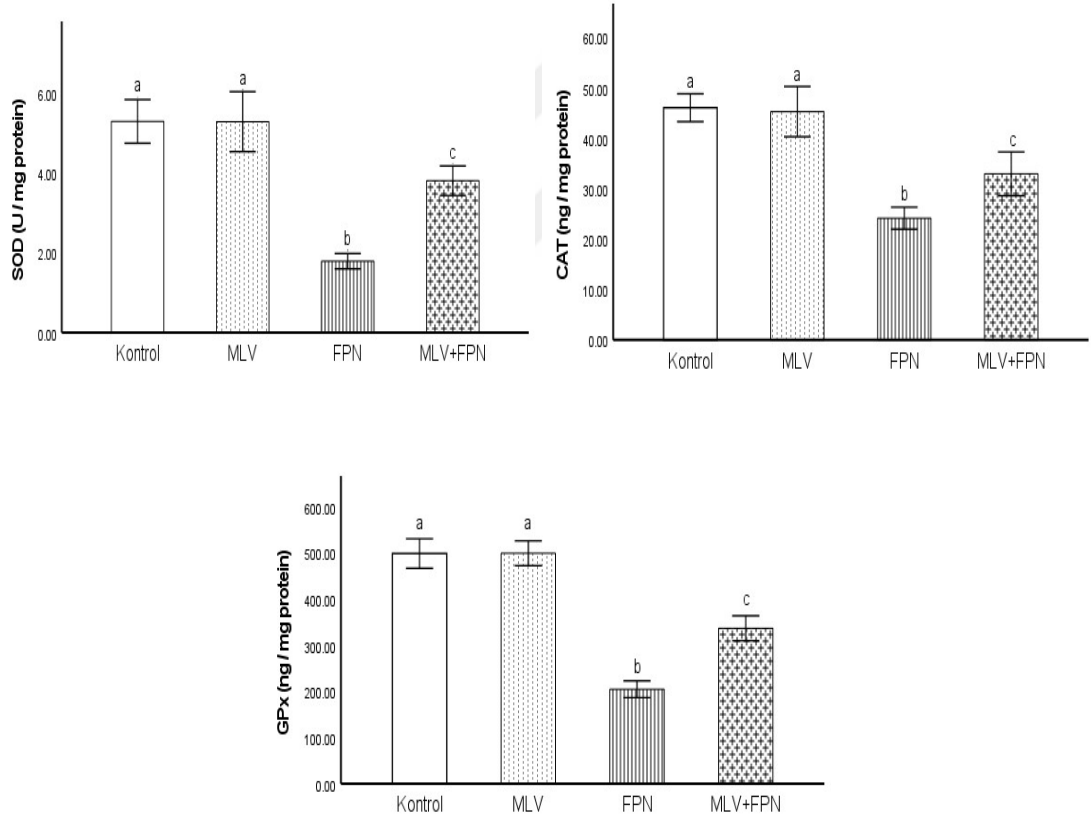
Tablo 4.1. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine etkileri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
AST (U/L)	56,60 $\pm$ 2,52 ^a	66,60 $\pm$ 1,63 ^a	165,90 $\pm$ 2,64 ^b	76,60 $\pm$ 1,57 ^c
ALT (U/L)	21,30 $\pm$ 1,15 ^a	23,70 $\pm$ 1,18 ^a	55,70 $\pm$ 3,61 ^b	27,80 $\pm$ 1,73 ^c
Kreatinin (mg/dL)	0,22 $\pm$ 0,09 ^a	0,24 $\pm$ 0,09 ^a	0,46 $\pm$ 0,17 ^b	0,31 $\pm$ 0,01 ^c
BUN (mg/dL)	23,30 $\pm$ 1,10 ^a	24,10 $\pm$ 1,00 ^a	52,90 $\pm$ 1,47 ^b	27,50 $\pm$ 0,92 ^c

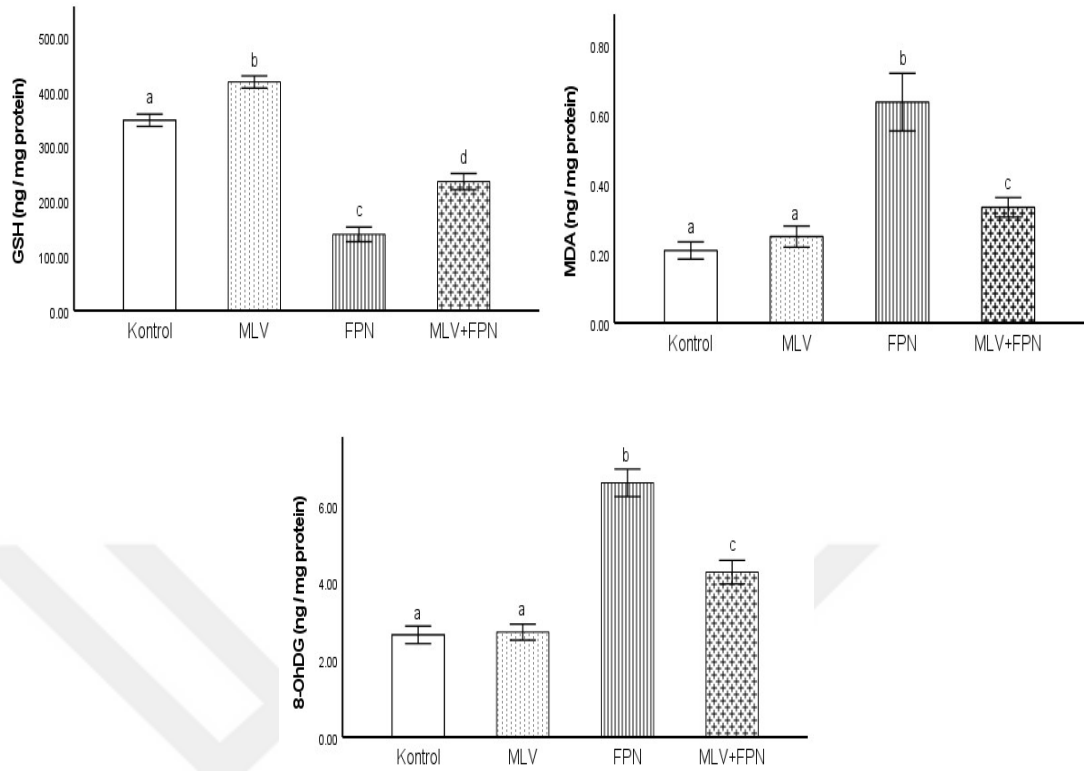
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri

Fipronil verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer, böbrek ve beyin doku örneklerinde MDA düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$); SOD, CAT ve GPx1 enzim etkinliği ile GSH düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edildi. Malvidin ve fipronilin birlikte verildiği grupta ise fipronilin tek başına verildiğinde artan MDA düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); SOD, CAT ve GPx1 enzimlerinin etkinliği ile GSH düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) belirlendi. Tek başına malvidin verilen grupta değerler kontrol grubuna benzer düzeylerdeydi (Tablo 4.2-4.4; Şekil 4.3-4.8).



Şekil 4.3. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularında antioksidan enzim etkinlikleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.4. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularında oksidatif stres parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 4.2. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularında oksidatif stres parametreleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
SOD	5,28 $\pm$ 0,22 ^a	5,27 $\pm$ 0,31 ^a	1,78 $\pm$ 0,08 ^b	3,79 $\pm$ 0,15 ^c
CAT	46,04 $\pm$ 1,12 ^a	45,26 $\pm$ 2,03 ^a	24,13 $\pm$ 0,89 ^b	32,93 $\pm$ 1,77 ^c
GPx1	498,89 $\pm$ 13,06 ^a	499,33 $\pm$ 10,97 ^a	204,81 $\pm$ 7,39 ^b	336,83 $\pm$ 11,08 ^c
GSH	347,76 $\pm$ 4,55 ^a	417,61 $\pm$ 4,58 ^b	139,28 $\pm$ 5,44 ^c	235,68 $\pm$ 6,10 ^d
MDA	0,20 $\pm$ 0,01 ^a	0,24 $\pm$ 0,01 ^a	0,63 $\pm$ 0,03 ^b	0,33 $\pm$ 0,01 ^c
8-OHdG	2,65 $\pm$ 0,09 ^a	2,72 $\pm$ 0,08 ^a	6,69 $\pm$ 0,14 ^b	4,27 $\pm$ 0,12 ^c

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

SOD: U/mg protein

CAT: ng/mg protein

GPx1: ng/mg protein

GSH: ng/mg protein

MDA: ng/mg protein

8-OHdG: ng/mg protein

Tablo 4.3. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularında oksidatif stres parametreleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
SOD	3,76±0,20 ^a	3,65±0,23 ^a	1,58±0,11 ^b	2,75±0,17 ^c
CAT	35,26±1,05 ^a	32,95±2,11 ^a	18,35±0,78 ^b	23,74±1,06 ^c
GPx1	326,14±6,62 ^a	319,95±4,80 ^a	143,58±4,67 ^b	240,88±8,38 ^c
GSH	218,84±1,73 ^a	275,02±3,98 ^b	85,56±3,85 ^c	173,45±3,79 ^d
MDA	0,34±0,02 ^a	0,40±0,04 ^a	0,96±0,05 ^b	0,55±0,01 ^c
8-OHdG	2,53±0,11 ^a	2,74±0,13 ^a	5,54±0,11 ^b	3,65±0,08 ^c

Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

SOD: U/mg protein

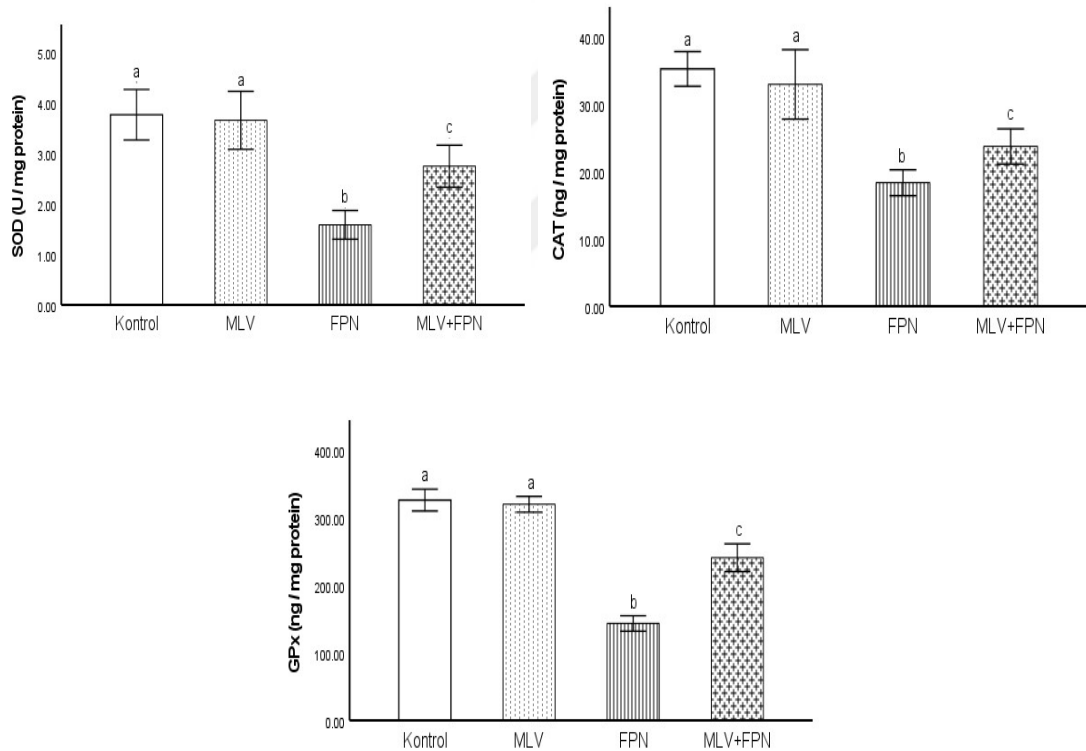
CAT: ng/mg protein

GPx1: ng/mg protein

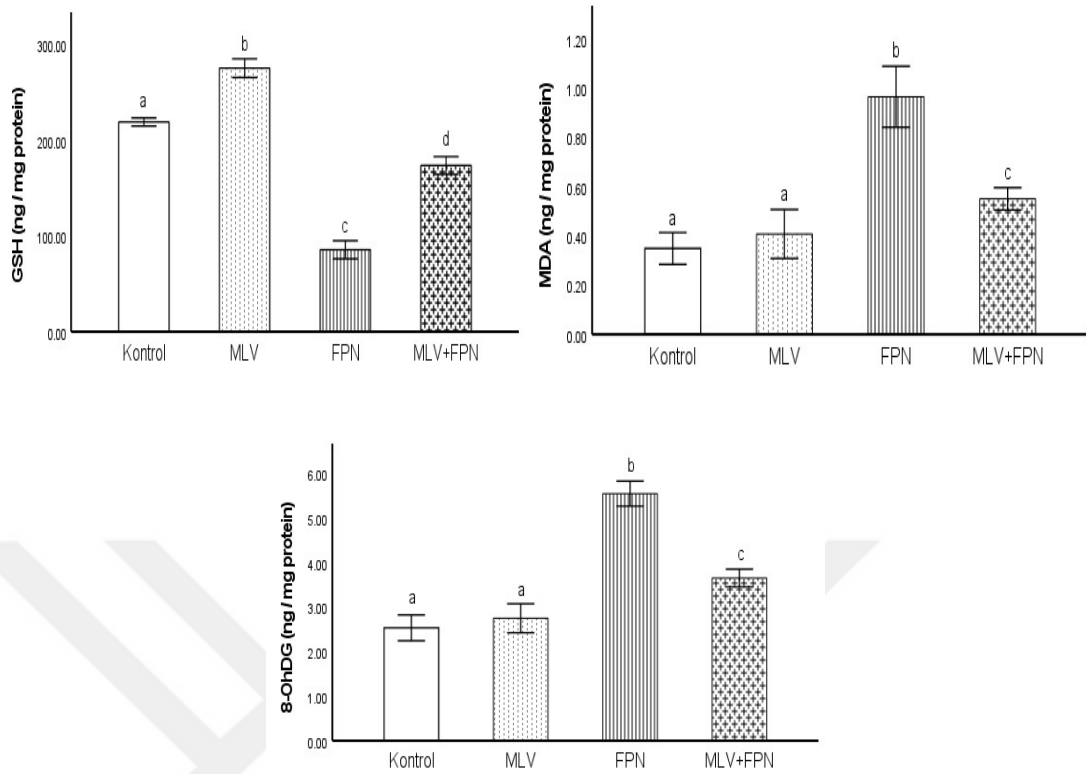
GSH: ng/mg protein

MDA: ng/mg protein

8-OHdG: ng/mg protein



Şekil 4.5. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularında antioksidan enzim etkinlikleri. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. a, b, c. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.6. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularında oksidatif stres parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4.4. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularında oksidatif stres parametreleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
SOD	0,55 $\pm$ 0,02 ^a	0,54 $\pm$ 0,01 ^a	0,23 $\pm$ 0,01 ^b	0,35 $\pm$ 0,01 ^c
CAT	10,83 $\pm$ 0,36 ^a	10,30 $\pm$ 0,20 ^a	2,92 $\pm$ 0,15 ^b	7,84 $\pm$ 0,12 ^c
GPx1	12,51 $\pm$ 0,57 ^a	13,49 $\pm$ 0,80 ^a	7,96 $\pm$ 0,29 ^b	10,32 $\pm$ 0,15 ^c
GSH	188,33 $\pm$ 1,69 ^a	232,13 $\pm$ 1,70 ^b	81,63 $\pm$ 4,80 ^c	156,69 $\pm$ 7,34 ^d
MDA	4,56 $\pm$ 0,15 ^a	4,76 $\pm$ 0,09 ^a	7,55 $\pm$ 0,13 ^b	5,83 $\pm$ 0,08 ^c
8-OHdG	10,70 $\pm$ 0,43 ^a	11,03 $\pm$ 0,69 ^a	21,89 $\pm$ 1,52 ^b	15,60 $\pm$ 0,36 ^c

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

SOD: U/mg protein

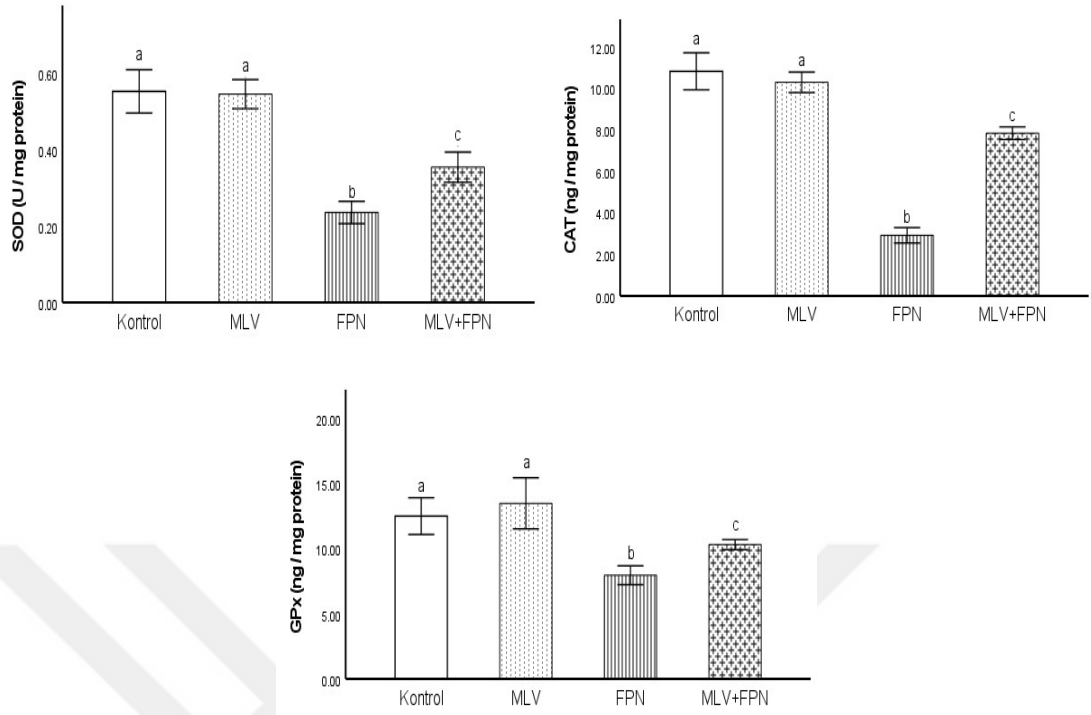
CAT: ng/mg protein

GPx1: ng/mg protein

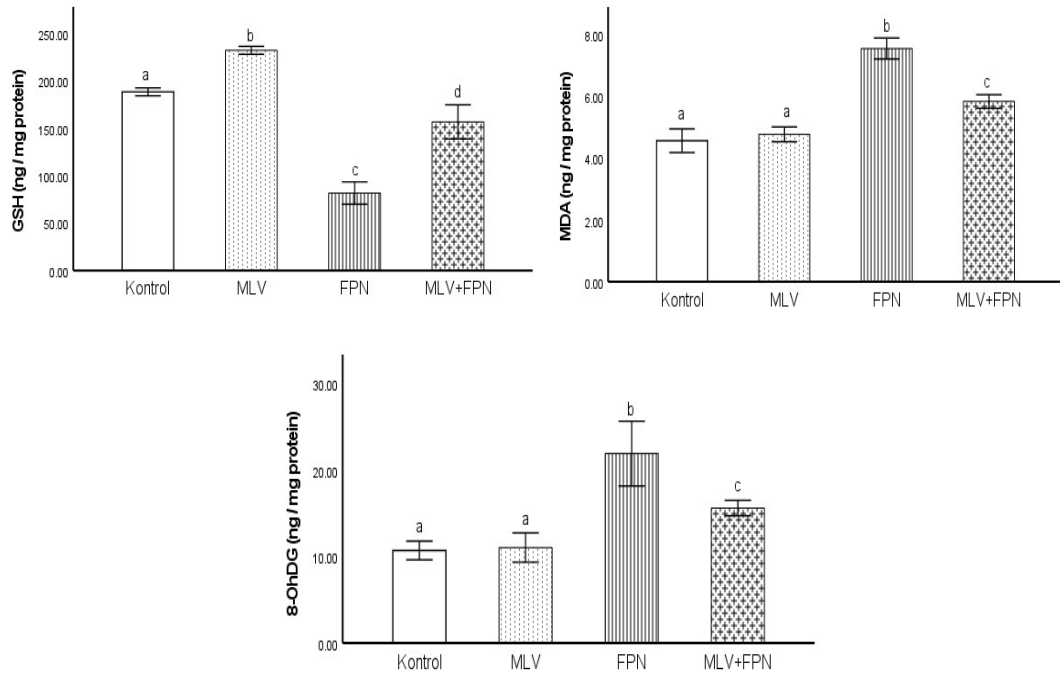
GSH: ng/mg protein

MDA: ng/mg protein

8-OHdG: ng/mg protein



Şekil 4.7. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularında antioksidan enzim etkinlikleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.8. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularında oksidatif stres parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

4.3. Antiinflatuar-İnflatuar Parametreler ve Transkripsiyon Faktör Düzeyleri

Fipronil verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer, böbrek ve beyin doku örneklerinde NF- κ B2, IL-1 β , TNF- α düzeyleri ile iNOS2, COX-2 etkinliklerinde önemli bir artış ($p<0,05$); Nrf2 düzeyinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edildi. Malvidin ve fipronilin birlikte verildiği grupta ise fipronilin tek başına verildiğinde artan NF- κ B2, IL-1 β , TNF- α düzeyleri ile iNOS2, COX-2 etkinliklerinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); Nrf2 düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) belirlendi. Tek başına malvidin verilen grupta değerler Nrf2 dışında kontrol grubuna benzer düzeylerdeydi (Tablo 4.5-4.7; Şekil 4.9-4.14).

Tablo 4.5. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularındaki yangısal parametreler ve transkripsiyon faktör düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
NF- κ B2	105,98 $\pm$ 4,11 ^a	101,60 $\pm$ 2,96 ^a	179,97 $\pm$ 5,89 ^b	126,83 $\pm$ 3,44 ^c
Nrf2	54,98 $\pm$ 2,49 ^a	95,54 $\pm$ 4,92 ^b	26,35 $\pm$ 1,46 ^c	76,64 $\pm$ 3,38 ^d
IL-1 β	10,28 $\pm$ 0,60 ^a	10,99 $\pm$ 0,73 ^a	27,94 $\pm$ 1,36 ^b	17,04 $\pm$ 0,87 ^c
TNF- α	9,98 $\pm$ 0,53 ^a	10,28 $\pm$ 0,58 ^a	24,56 $\pm$ 1,18 ^b	16,74 $\pm$ 1,01 ^c
iNOS2	74,87 $\pm$ 2,03 ^a	74,93 $\pm$ 5,84 ^a	130,97 $\pm$ 3,68 ^b	104,62 $\pm$ 2,70 ^c
COX-2	524,55 $\pm$ 5,25 ^a	539,99 $\pm$ 7,06 ^a	841,72 $\pm$ 5,99 ^b	622,43 $\pm$ 7,16 ^c

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

NF- κ B2: ng/mg protein

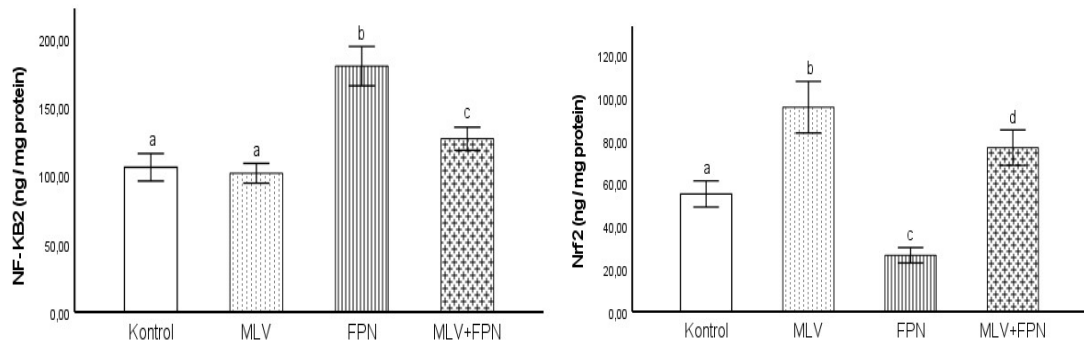
Nrf2: ng/mg protein

IL-1 β : ng/mg protein

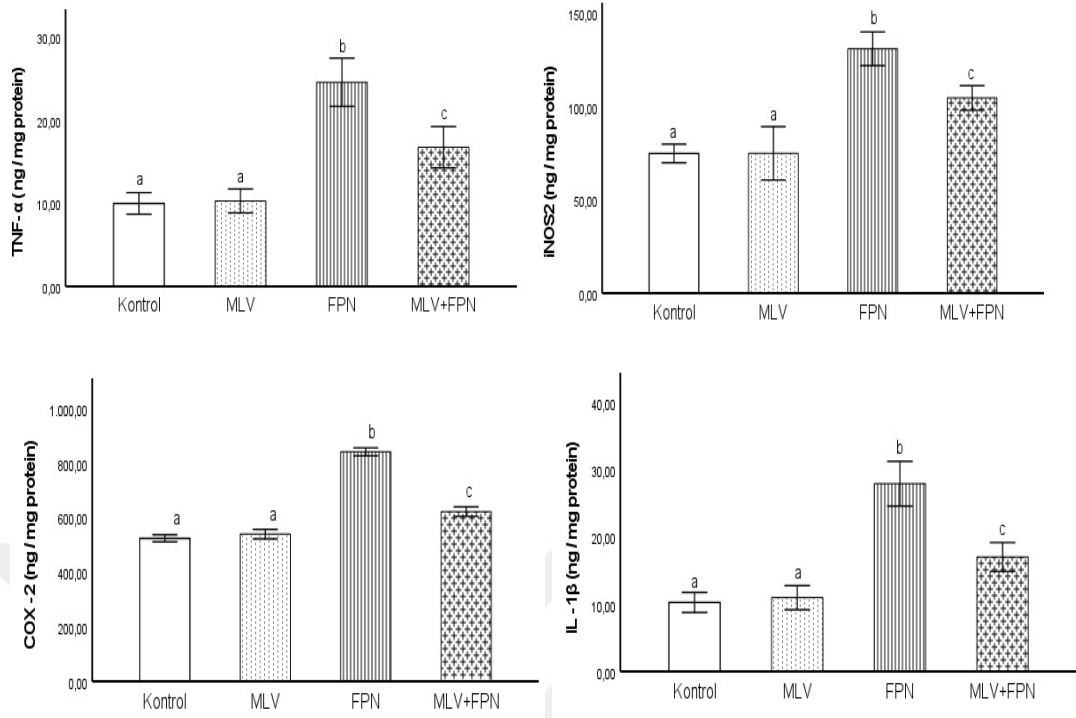
TNF- α : ng/mg protein

iNOS2: ng/mg protein

COX-2: ng/mg protein



Şekil 4.9. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.10. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer dokularındaki yangısal parametreler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Tablo 4.6. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularındaki yangısal parametreler ve transkripsiyon faktör düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
NF-κB2	46,87 $\pm$ 2,76 ^a	49,56 $\pm$ 3,04 ^a	132,56 $\pm$ 6,70 ^b	89,37 $\pm$ 4,17 ^c
Nrf2	23,66 $\pm$ 0,97 ^a	43,97 $\pm$ 3,25 ^b	14,55 $\pm$ 0,86 ^c	33,42 $\pm$ 1,13 ^d
IL-1β	12,34 $\pm$ 0,58 ^a	11,60 $\pm$ 0,97 ^a	27,93 $\pm$ 1,03 ^b	16,82 $\pm$ 0,71 ^c
TNF-α	4,49 $\pm$ 0,34 ^a	4,03 $\pm$ 0,29 ^a	11,77 $\pm$ 0,83 ^b	7,82 $\pm$ 0,34 ^c
iNOS2	43,01 $\pm$ 2,33 ^a	44,05 $\pm$ 2,26 ^b	90,55 $\pm$ 4,72 ^c	76,67 $\pm$ 1,65 ^d
COX-2	216,86 $\pm$ 1,96 ^a	219,66 $\pm$ 0,89 ^a	371,67 $\pm$ 7,12 ^b	270,93 $\pm$ 5,80 ^c

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

NF-κB2: ng/mg protein

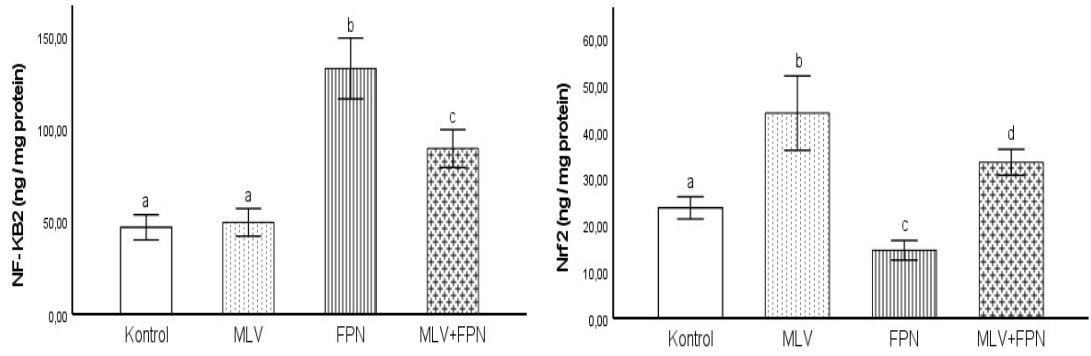
Nrf2: ng/mg protein

IL-1β: ng/mg protein

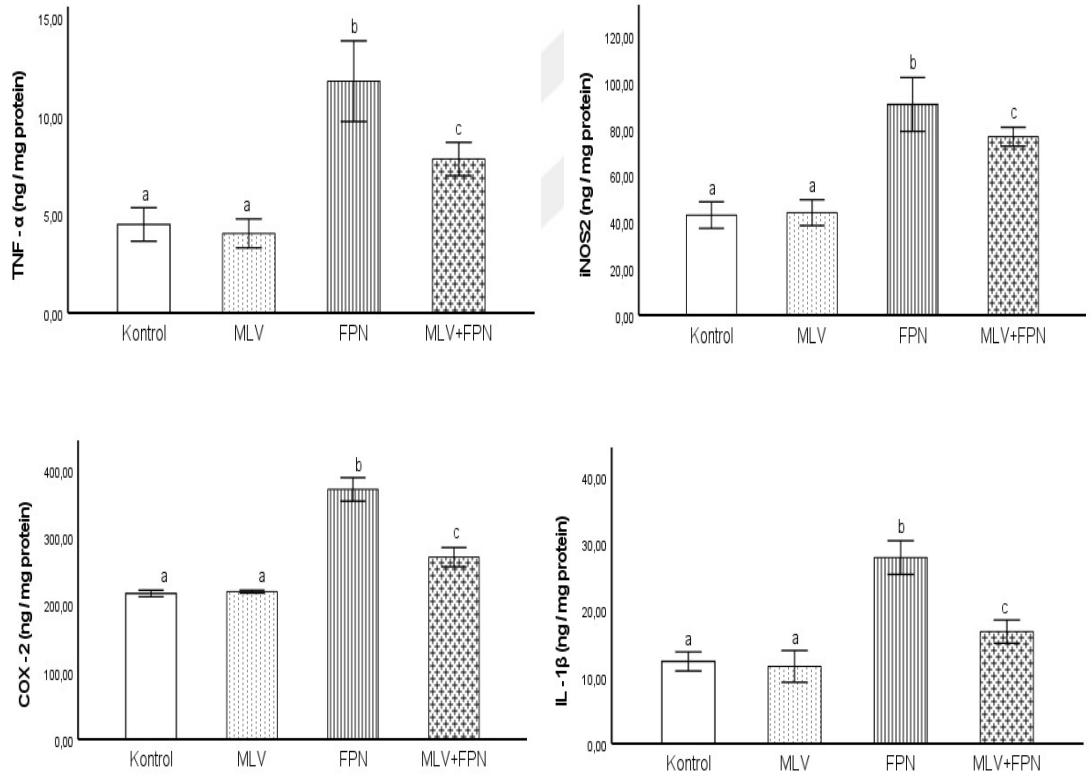
TNF-α: ng/mg protein

iNOS2: ng/mg protein

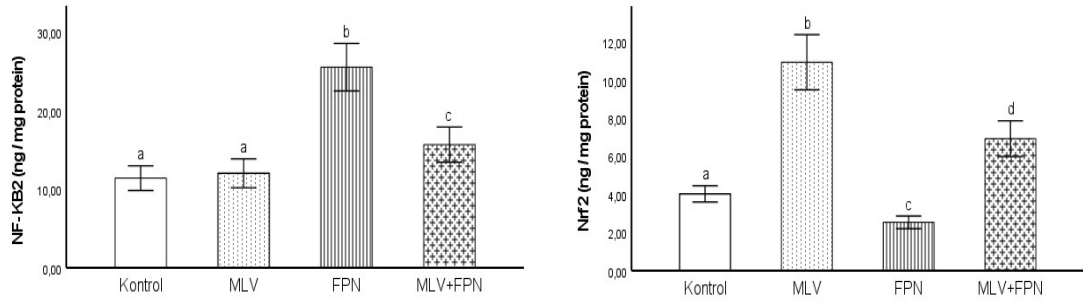
COX-2: ng/mg protein



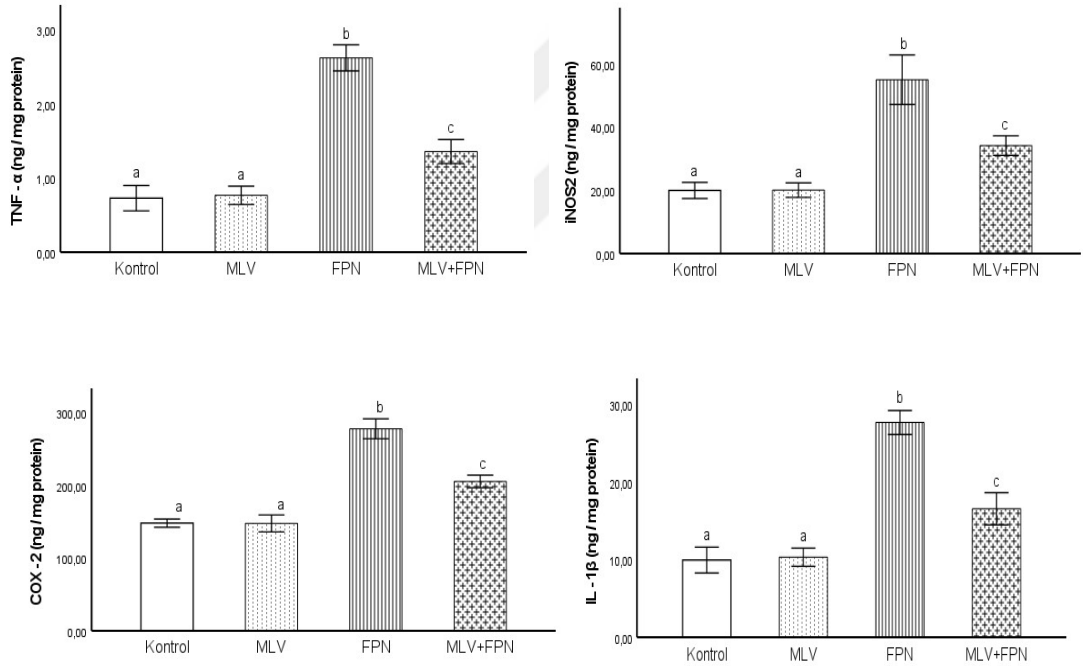
Şekil 4.11. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.12. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) böbrek dokularındaki yangısal parametreler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.13. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularındaki transkripsiyon faktör düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.14. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularındaki yangısal parametreler. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Tablo 4.7. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) beyin dokularındaki yangısal parametreler.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+FPN
NF- κ B2	11,40 $\pm$ 0,63 ^a	12,03 $\pm$ 0,75 ^a	25,52 $\pm$ 1,23 ^b	15,67 $\pm$ 0,91 ^c
Nrf2	4,03 $\pm$ 0,17 ^a	10,94 $\pm$ 0,59 ^b	2,54 $\pm$ 0,13 ^c	6,93 $\pm$ 0,38 ^d
IL-1 β	9,94 $\pm$ 0,68 ^a	10,31 $\pm$ 0,47 ^a	27,65 $\pm$ 0,63 ^b	16,55 $\pm$ 0,84 ^c
TNF- α	0,72 $\pm$ 0,06 ^a	0,76 $\pm$ 0,05 ^a	2,62 $\pm$ 0,07 ^b	1,35 $\pm$ 0,06 ^c
iNOS2	19,99 $\pm$ 1,04 ^a	20,07 $\pm$ 0,93 ^a	55,01 $\pm$ 3,20 ^b	34,17 $\pm$ 1,26 ^c
COX-2	148,12 $\pm$ 2,31 ^a	147,72 $\pm$ 4,77 ^a	277,79 $\pm$ 5,60 ^b	205,40 $\pm$ 3,51 ^c

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,05$).

NF- κ B2: ng/mg protein

Nrf2: ng/mg protein

IL-1 β : ng/mg protein

TNF- α : ng/mg protein

iNOS2: ng/mg protein

COX-2: ng/mg protein

4.4. Histopatolojik Bulgular

Gruplara göre karaciğerlerin histopatolojik incelemesinde kontrol grubundaki farelerde normal doku histolojik görünümü saptandı. Fipronil grubundaki farelerin karaciğerlerinde şiddetli hiperemi, yer yer kanama odakları, hafif şiddette ve çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu yangısal hücre infiltrasyonları, Kupffer hücrelerinde proliferasyon, hepatositlerde yağlanma (steatozis) ve dejenerasyonların bulunduğu dikkati çekti. Bu gruptaki iki farede bazı hepatositlerde nekrozlar görüldü. Malvidinin, malvidin ve fipronilin beraber verildiği gruptaki patolojik bulguların önemli ölçüde azaldığı dikkati çekti. Sadece malvidin uygulanan grupta patolojik bulgu saptanmadı (Şekil 4.15). Histopatolojik skorların istatistik analiz bulguları Tablo 4.8.'de verilmiştir.

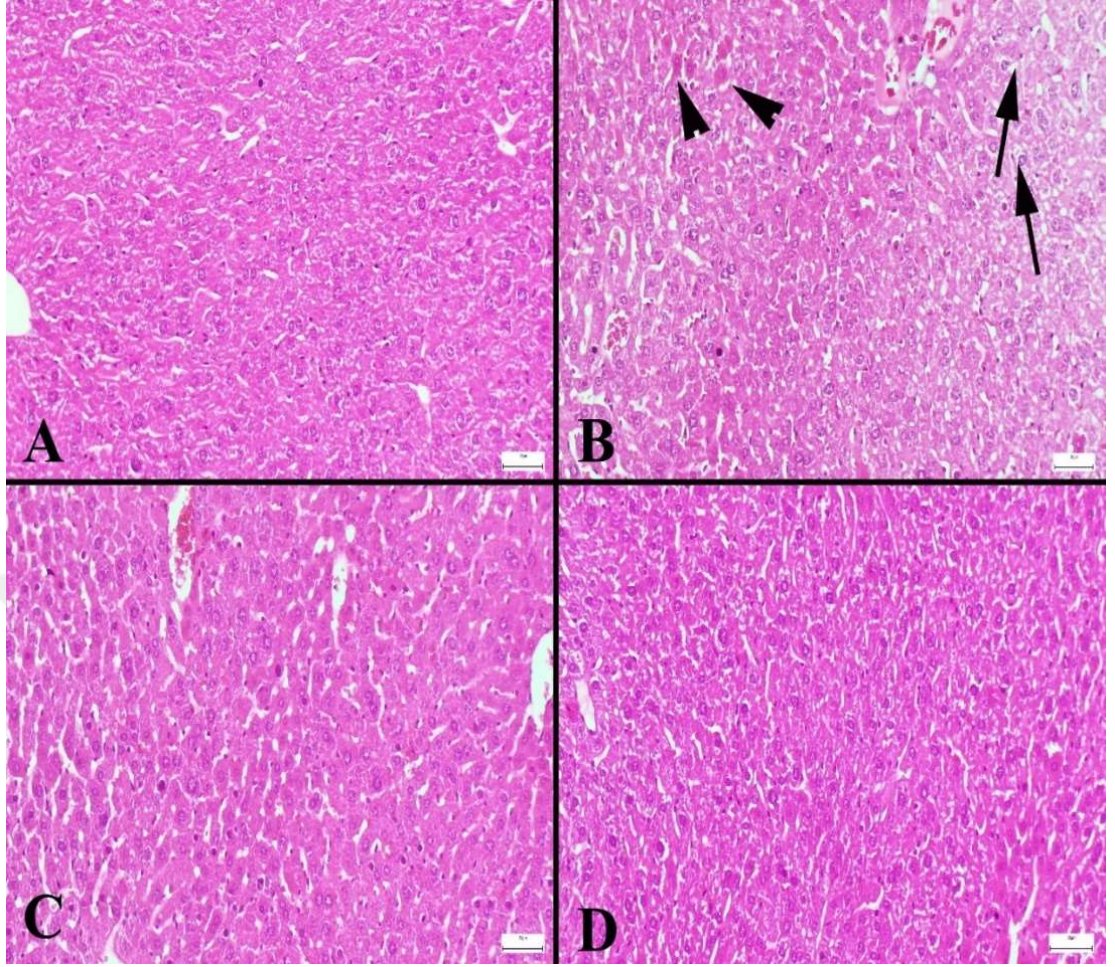
Böbrek kesitleri incelendiğinde kontrol grubundaki farelerin normal görünümde böbrekleri olduğu gözlemlendi. Fipronil grubunda ise böbreklerde şiddetli hiperemi, yer yer değişik şiddette kanamalar, tubul epitellerinde dökülmeler ve değişik şiddette yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti. Malvidin uygulamaları böbreklerdeki fipronil nedeniyle oluşan patolojik bulguları önemli ölçüde azaltmıştı. Tek başına malvidin uygulamalarının böbreklerde patolojik bir bulguya sebep olmadığı saptandı (Şekil 4.16). Histopatolojik skorların istatistik analiz bulguları Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Beyin, beyincik ve hipokampusların histopatolojik incelemesinde kontrol grubu farelerde normal doku histolojileri dikkati çekti. Fipronil grubunda ise damarlarda şiddetli hiperemi, belirgin ödem, yer yer değişik şiddetlerde kanamalar ile nöronlarda dejeneratif değişiklikler ve bazı alanlarda nekrotik hücreler dikkati çekti. Malvidin uygulamalarının beyinde şekillenen patolojik bulguları önemli ölçüde azalttığı saptandı. Malvidinin tek başına uygulamasının herhangi bir lezyona sebep olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.17-4.19). Histopatolojik skorların istatistik analiz bulguları Tablo 4.8’de verilmiştir.

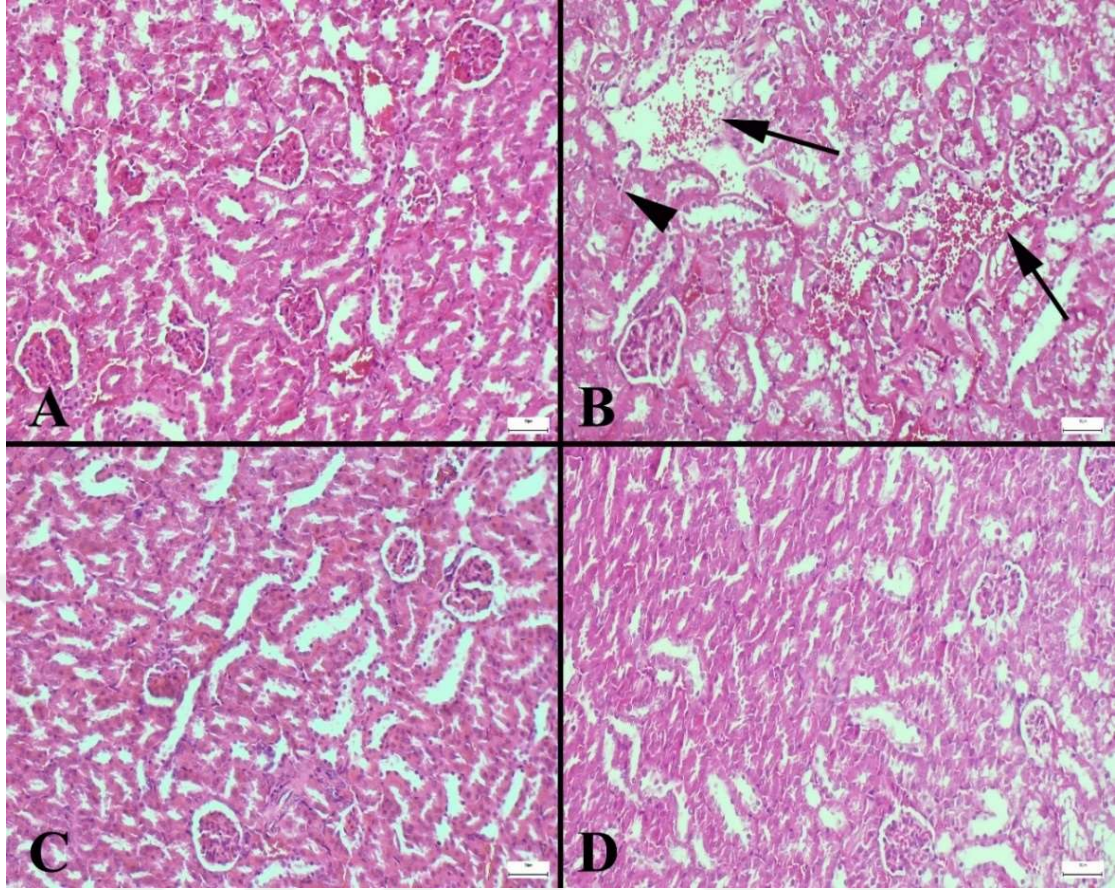
Tablo 4.8. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) karaciğer, böbrek, beyin, beyincik ve hipokampus dokularında histopatoloji skorlarının istatistiksel analizi.

Dokular	Gruplar				<i>p</i> değeri
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+ FPN	
Karaciğer	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,44±0,52 ^b	0,66±0,50 ^c	<0,001
Böbrek	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,55±0,52 ^b	0,44±0,17 ^c	<0,001
Beyin	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,33±0,50 ^b	0,33±0,16 ^a	<0,001
Beyincik	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,44±0,52 ^b	0,44±0,24 ^a	<0,001
Hipokampus	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,44±0,17 ^b	0,22±0,14 ^{ab}	<0,05

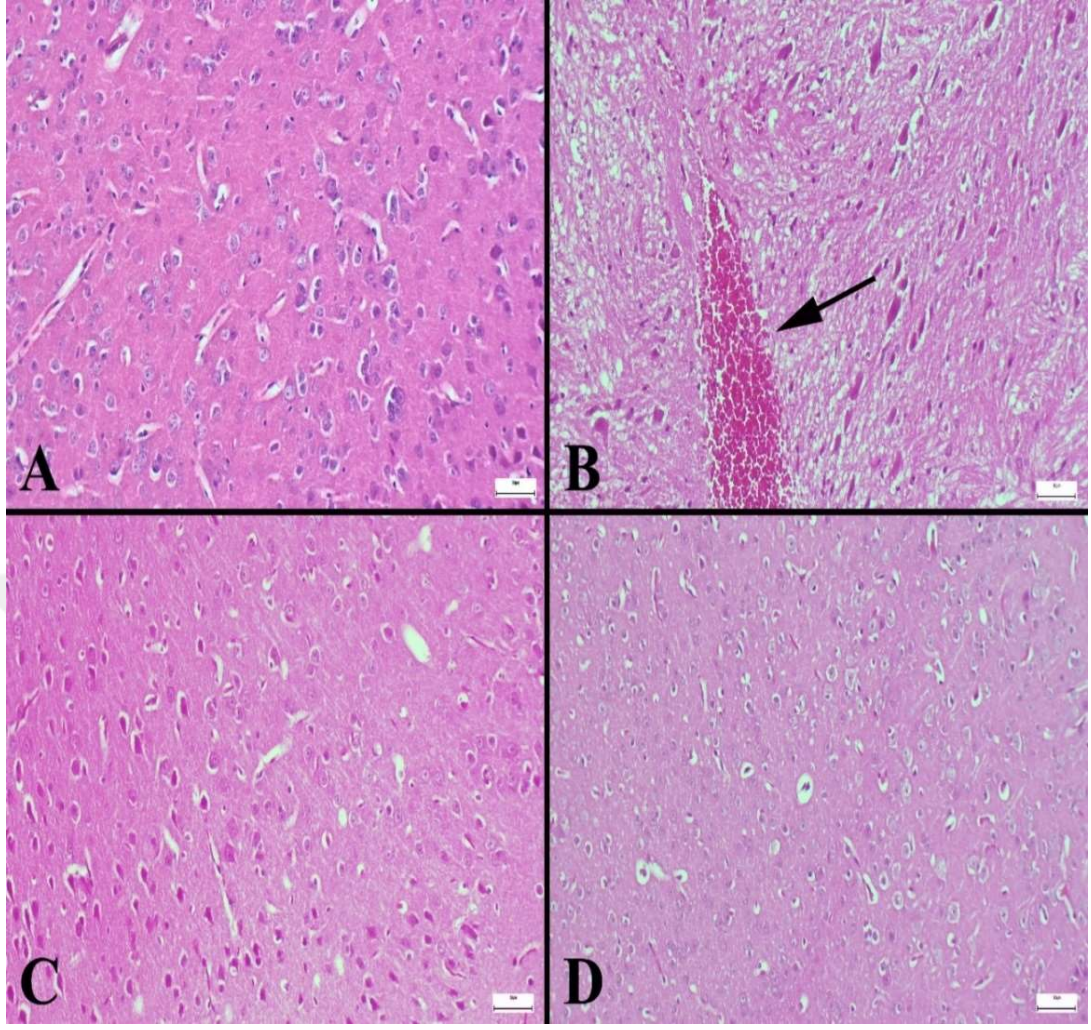
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a, b, ab, c. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,001$).



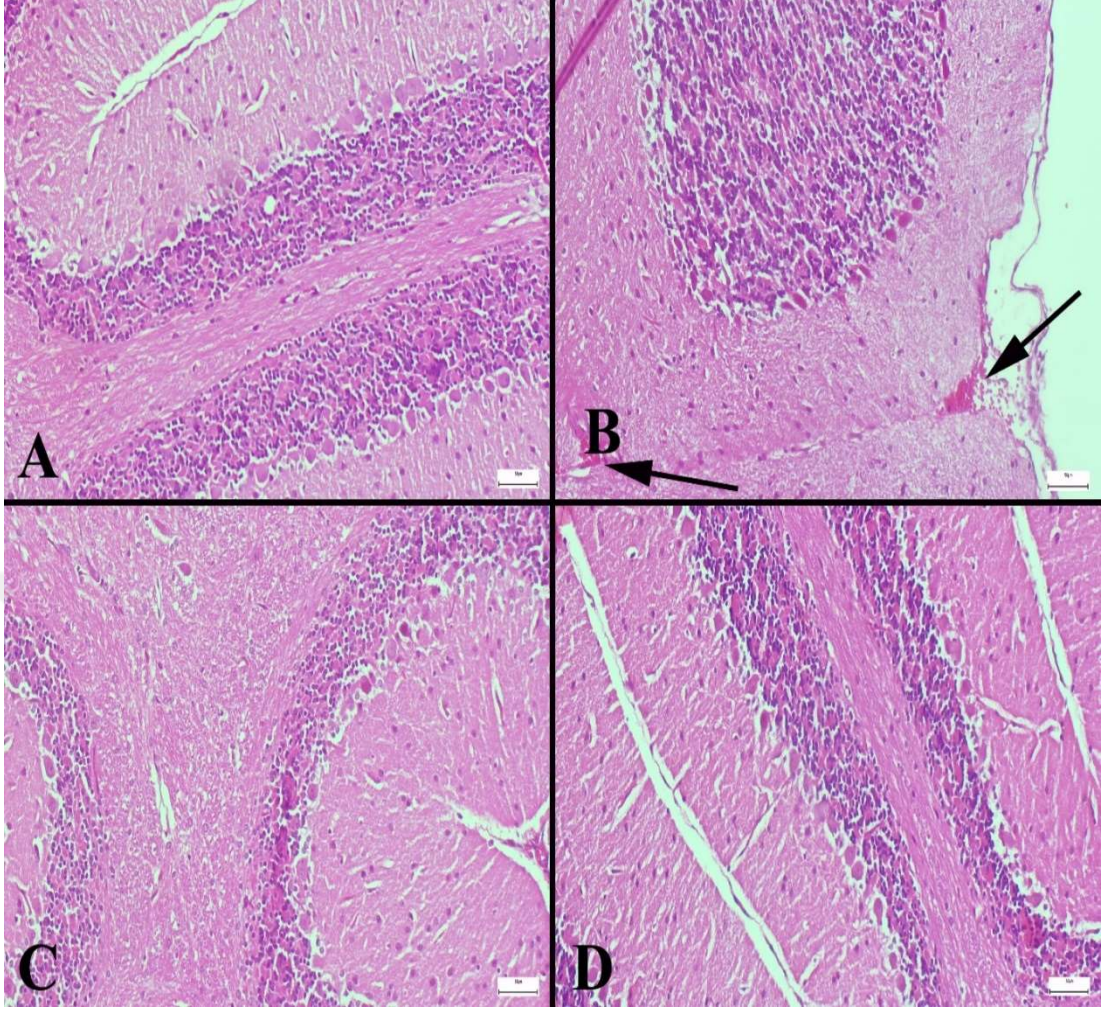
Şekil 4.15. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünimleri. (A) Kontrol grubunda normal görünümde karaciğer histolojik yapısı. (B) Fipronil (FPN) grubunda hepatosit sitoplazmalarında steatozis (oklar) ve hepatositlerde dejenerasyon (ok başları). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda patolojik bulgularda önemli ölçüde azalma. (D) Malvidin (MLV) grubunda normal karaciğer mikroskopik görüntüsü, HE, Barlar=50µm.



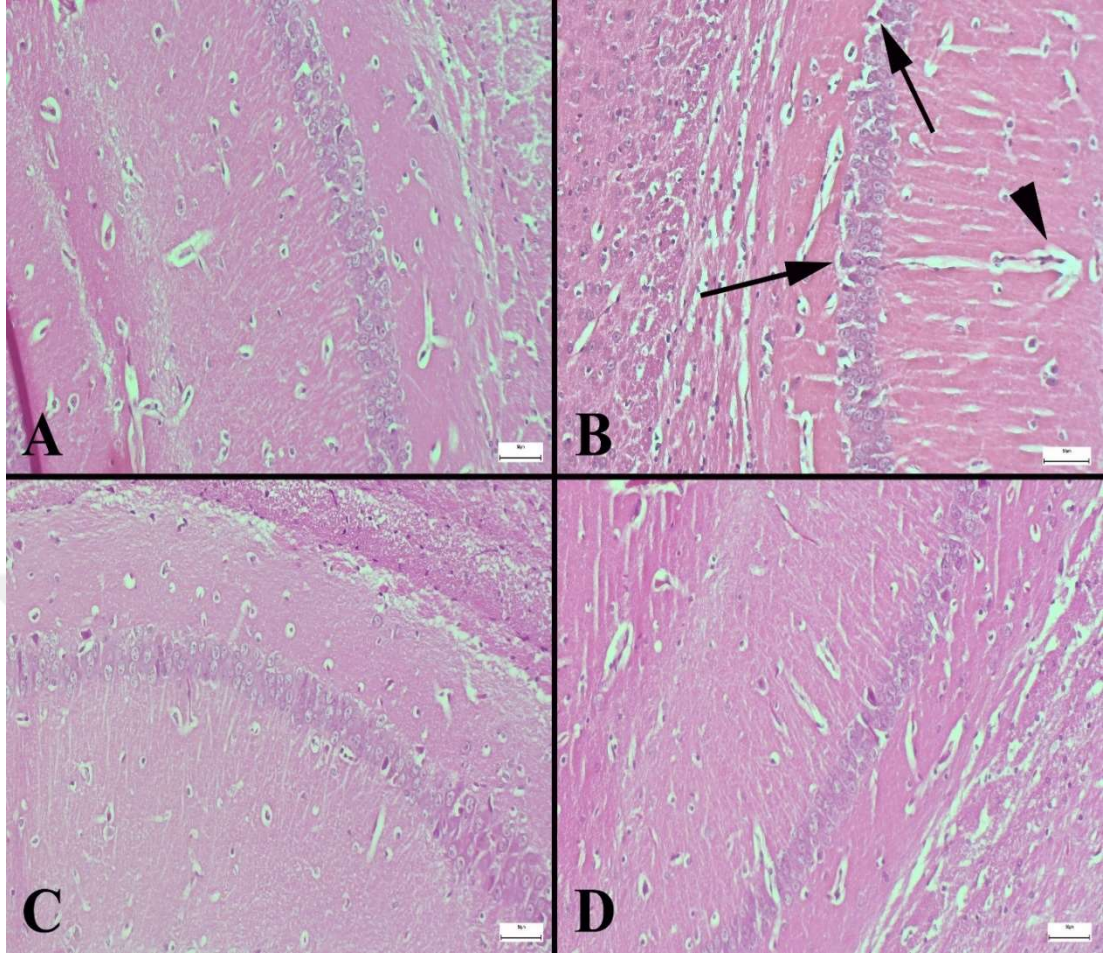
Şekil 4.16. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünüşleri. (A) Kontrol grubunda normal böbrek histolojisi. (B) Fipronil (FPN) grubunda bir farenin böbreğinde şiddetli kanama (oklar) ve hafif yangısal hücre infiltrasyonları (ok başı). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda patolojik bulgularda önemli ölçüde azalma. (D) Malvidin (MLV) grubunda normal böbrek histolojisi, HE, Barlar=50µm.



Şekil 4.17. Araştırma gruplarının beyin dokularına ait histopatolojik görünüşleri. (A) Kontrol grubunda normal beyin histolojik görüntüsü. (B) Fipronil (FPN) grubunda bir farenin beyinde şiddetli kanama (ok). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda patolojik bulgularda belirgin şekilde azalma. (D) Malvidin (MLV) grubunda normal görünümde beyin, HE, Barlar=50µm.



Şekil 4.18. Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait histopatolojik görünüşleri. (A) Kontrol grubunda normal beyincik yapısı. (B) Fipronil (FPN) grubunda bir farenin beyincğinde iki alanda belirgin kanama odakları (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda patolojik bulgularda önemli ölçüde azalma. (D) Malvidin (MLV) grubunda normal görünümde beyincik histolojisi, HE, Barlar=50µm.



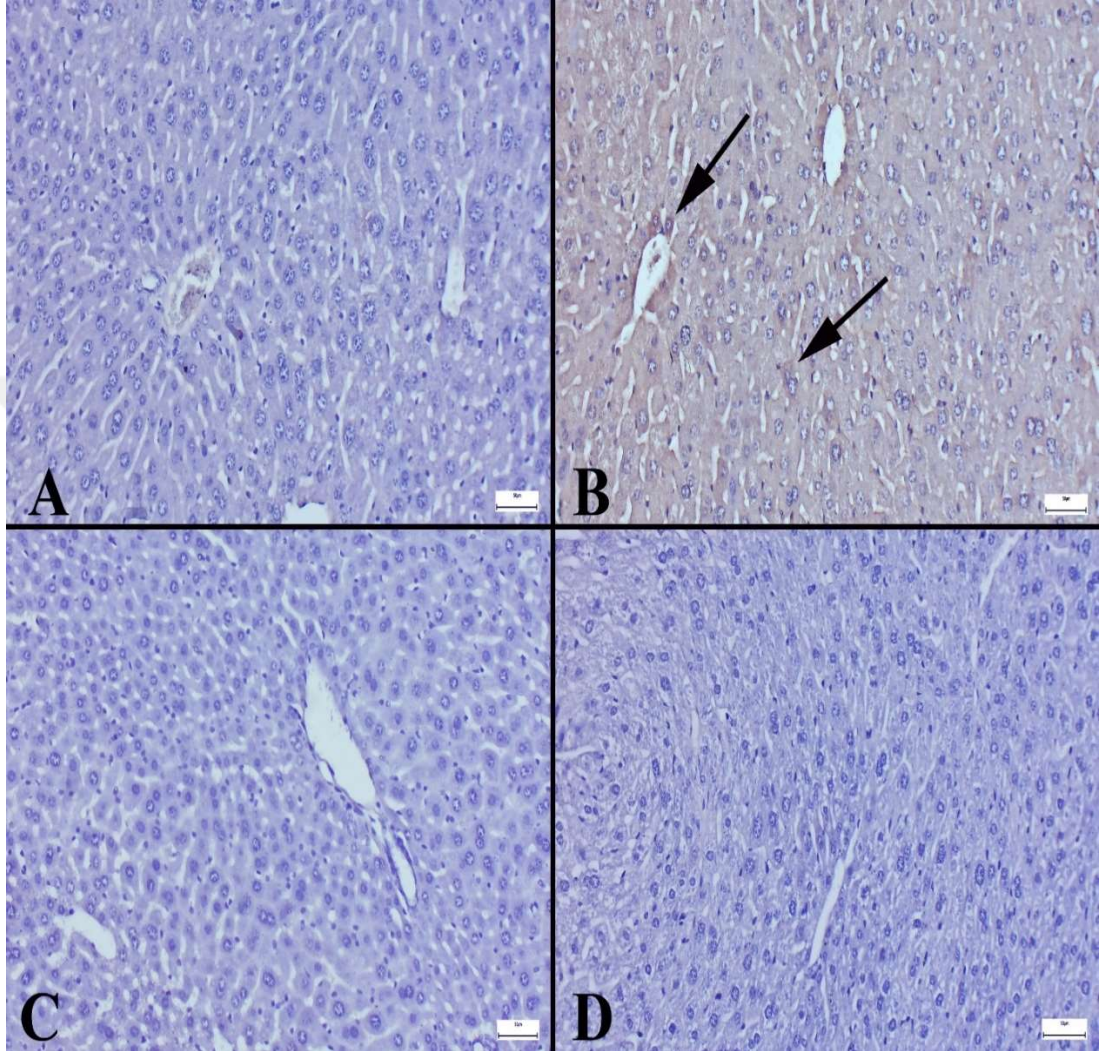
Şekil 4.19. Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait histopatolojik görünimleri. (A) Kontrol grubunda normal hipokampus histolojik yapısı. (B) Fipronil (FPN) grubunda perivasküler alanlarda belirgin kalınlaşma ile karakterize ödem tablosu (ok başı) ve nöronlarda büzüşme ile karakterize dejeneratif değişiklikler (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda lezyonlarda önemli ölçüde azalma. (D) Malvidin (MLV) grubunda normal hipokampus mikroskopik görüntüsü, HE, Barlar=50µm.

4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

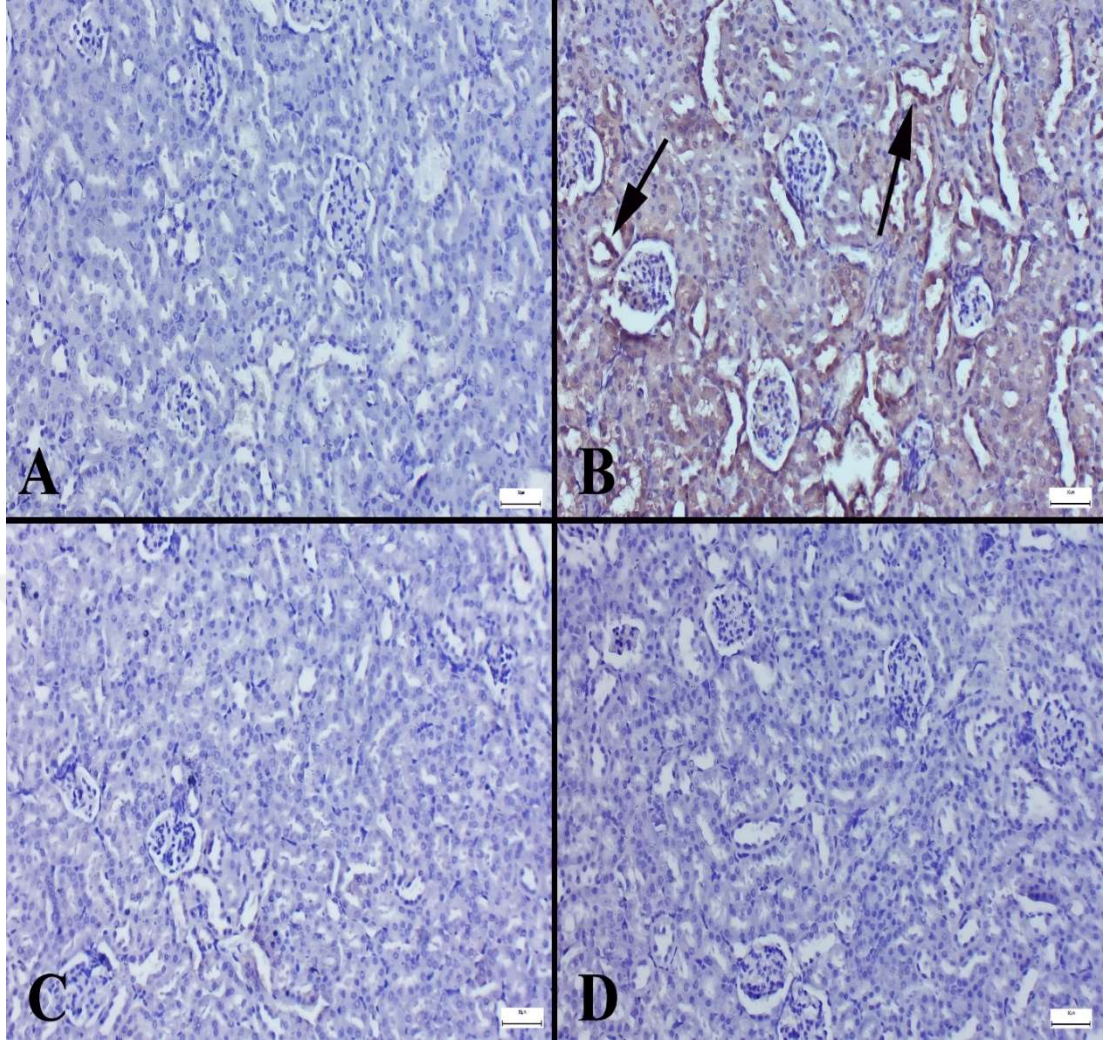
4.5.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

Kaspaz-3 ekspresyonlarının gruplar arasındaki karşılaştırmaları yapıldığında beyin, karaciğer ve böbrek kesitlerinde kontrol grubunda negatif veya hafif ekspresyonlar gözlenirken fipronil uygulamasının tüm organlarda ekspresyonları belirgin şekilde arttırdığı dikkati çekti. Malvidin uygulamalarının fipronilin arttırdığı ekspresyonları azalttığı ve bazı hayvanlarda ise tamamen negatifleştirdiği gözlemlendi.

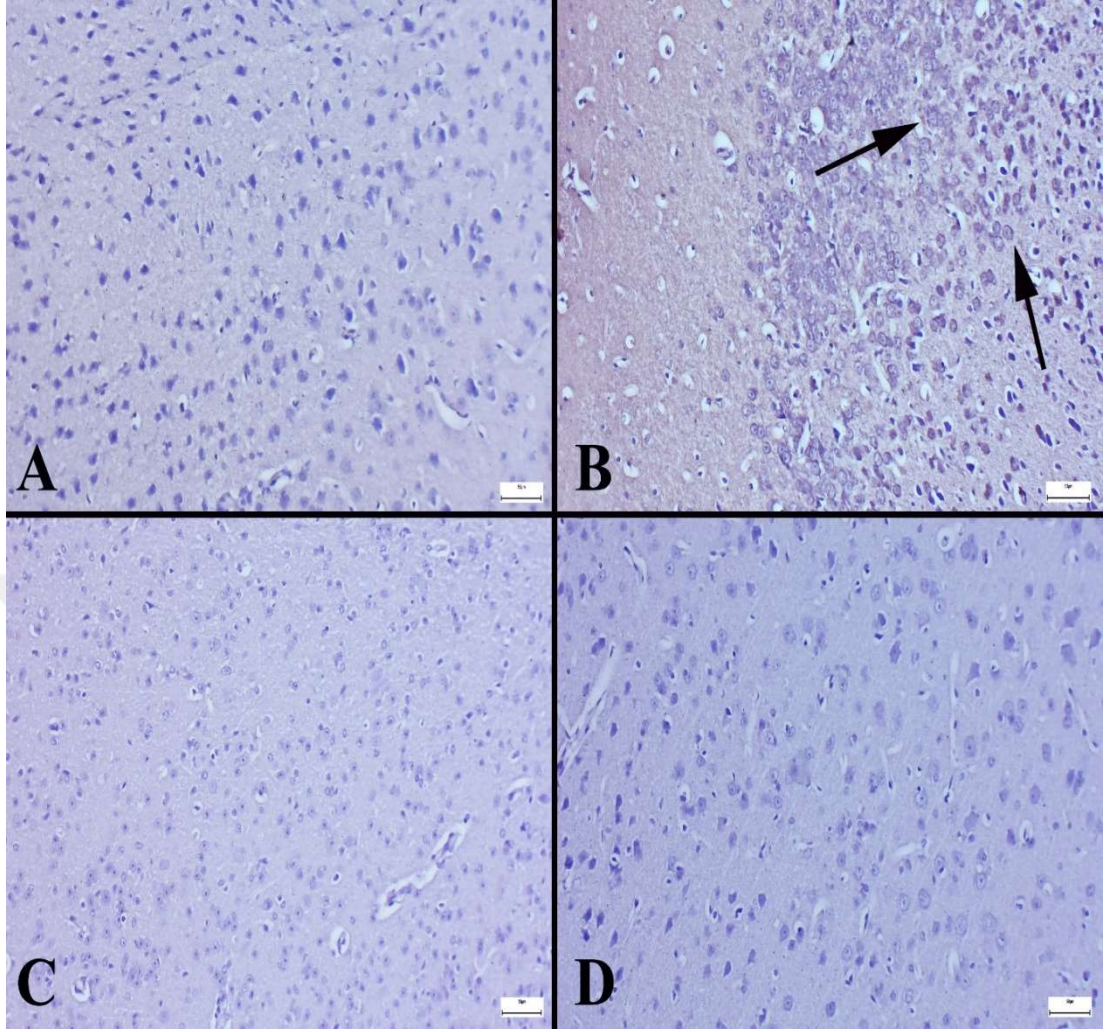
Malvidin tek başına uygulandığında ekspresyonları azalttığı tespit edildi (Şekil 4.20-4.24). İmmunohistokimyasal olarak pozitif hücre yüzdesinin istatistik analiz bulguları Tablo 4.9.'da verilmiştir.



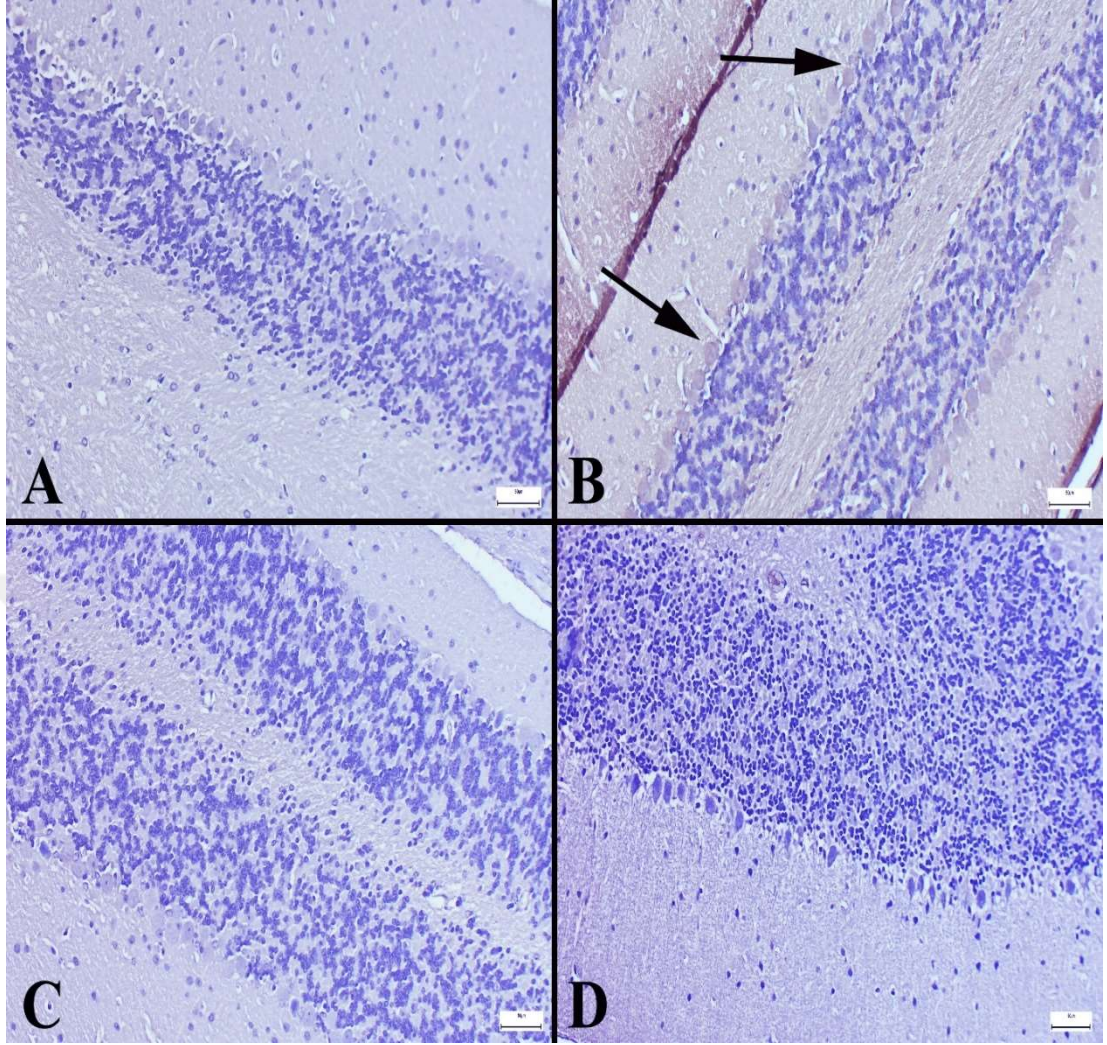
Şekil 4.20. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümü. (A) Kontrol grubunda bir farede negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda bir farenin karaciğerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda hepatositlerde negatif ekspresyon. (D) Malvidin (MLV) grubunda hepatositlerde negatif ekspresyon, Streptavidin Biyotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



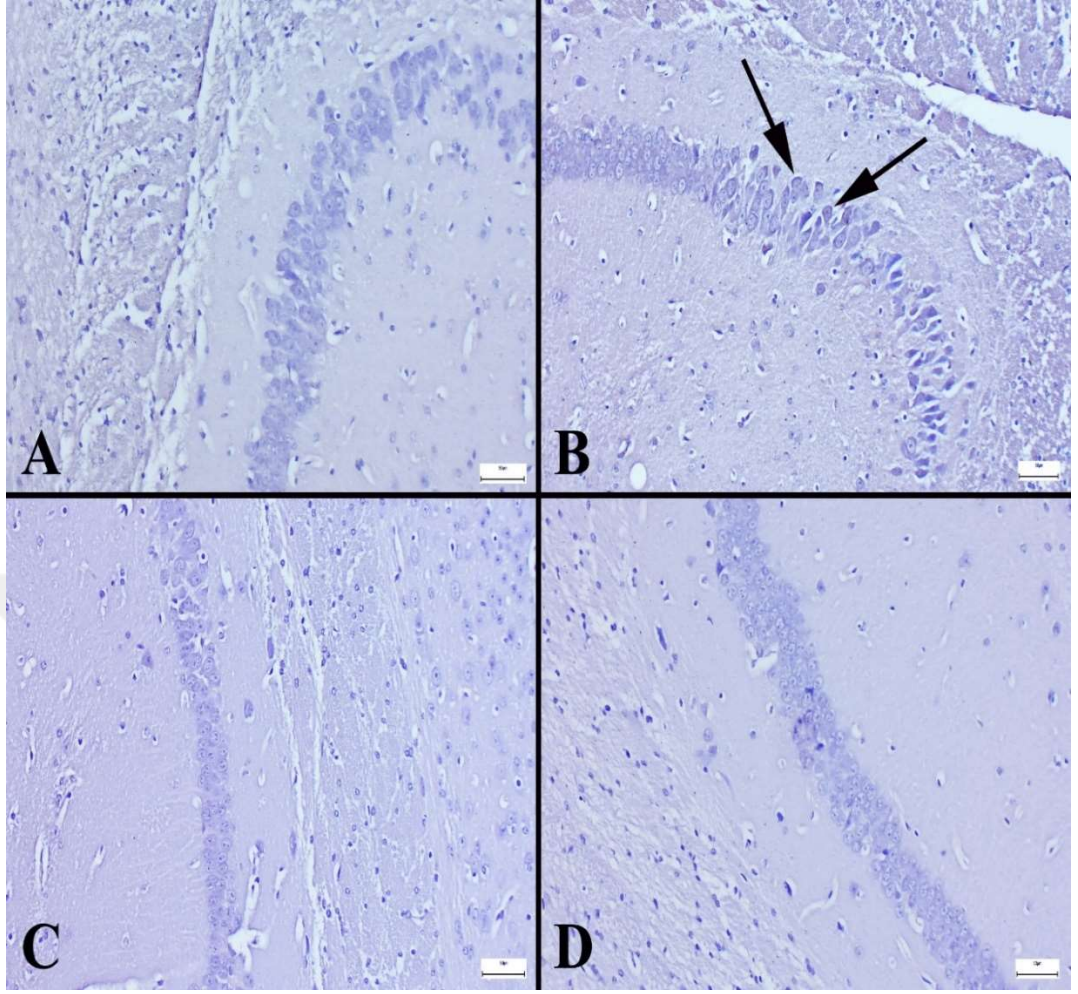
Şekil 4.21. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.22. Araştırma gruplarının beyin dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif kaspaz-3 ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.23. Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif kaspaz-3 ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda Purkinje hücrelerinde ve diğer nöronlarda belirgin ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.24. Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümleri. (A) Kontrol grubundaki bir farenin nöronlarda negatif ekspresyonlar. (B) Fipronil grubundaki nöronlarda artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biyotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.

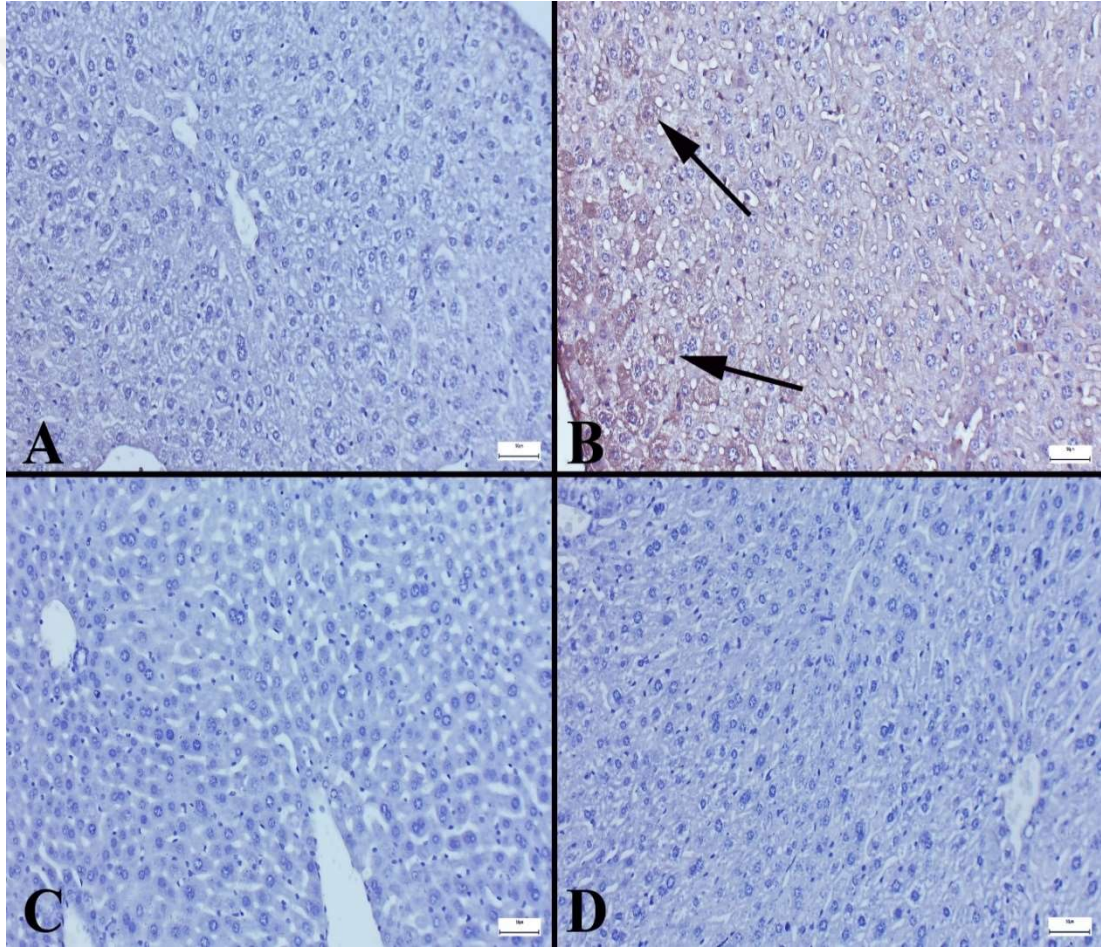
Tablo 4.9. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) dokulardaki kaspaz-3 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi.

Dokular	Gruplar				p değeri
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+ FPN	
Karaciğer	1,33±1,11 ^a	0,62±0,32 ^a	20,11±3,33 ^b	1,66±0,62 ^a	<0,001
Böbrek	0,77±0,36 ^a	1,12±0,63 ^a	22,77±2,94 ^b	3,22±3,19 ^a	<0,001
Beyin	1,55±0,66 ^a	0,62±0,32 ^a	20,44±2,06 ^b	2,11±0,78 ^a	<0,001
Beyincik	1,66±0,68 ^a	1,12±0,47 ^a	20,44±2,06 ^b	2,00±2,00 ^a	<0,001
Hipokampus	0,55±0,29 ^a	0,25±0,16 ^a	6,33±2,50 ^b	1,33±0,50 ^a	<0,001

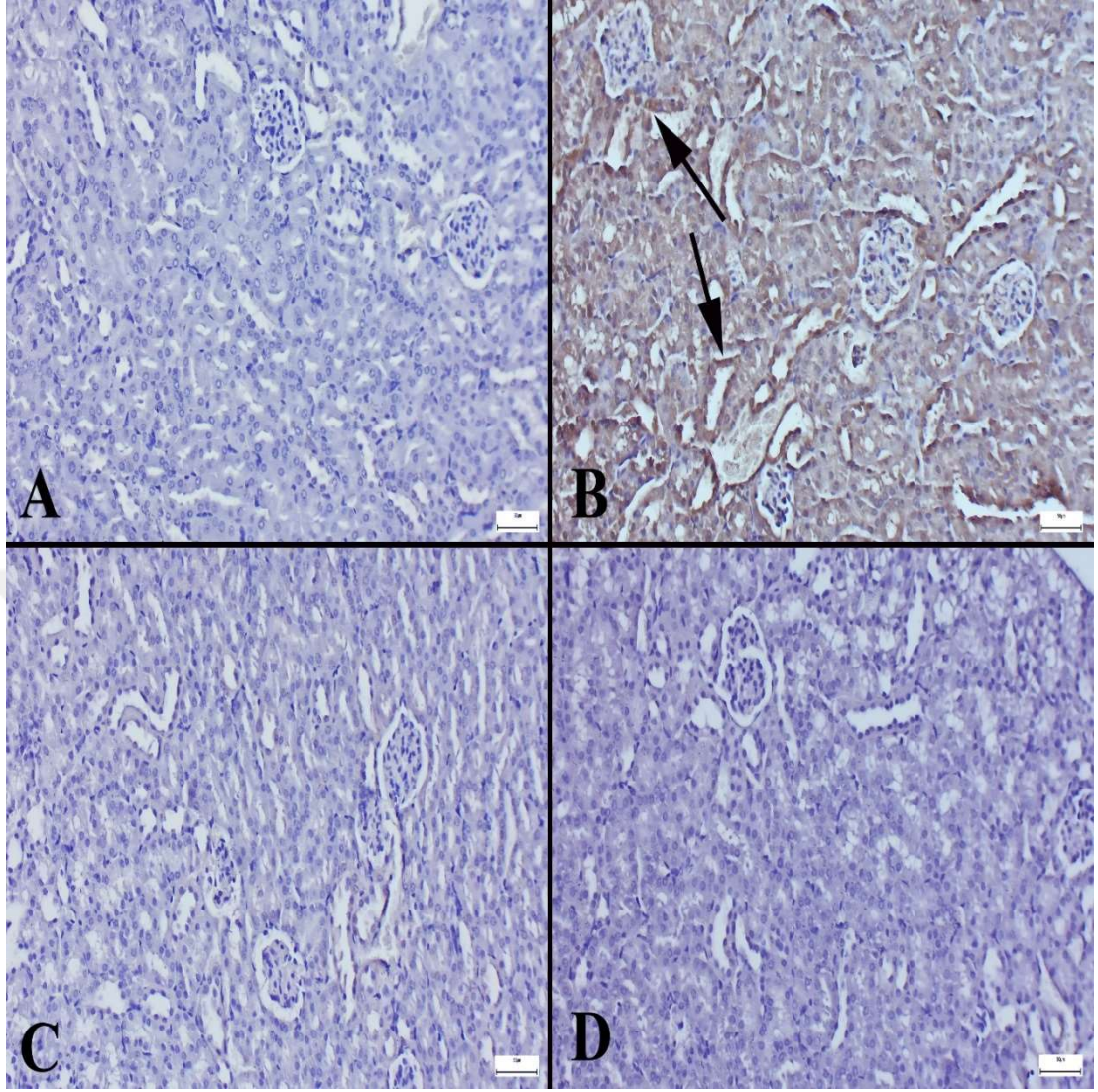
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a, b. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,001$).

4.5.2. Kaspaz-9 İmmunohistokimyasal Bulguları

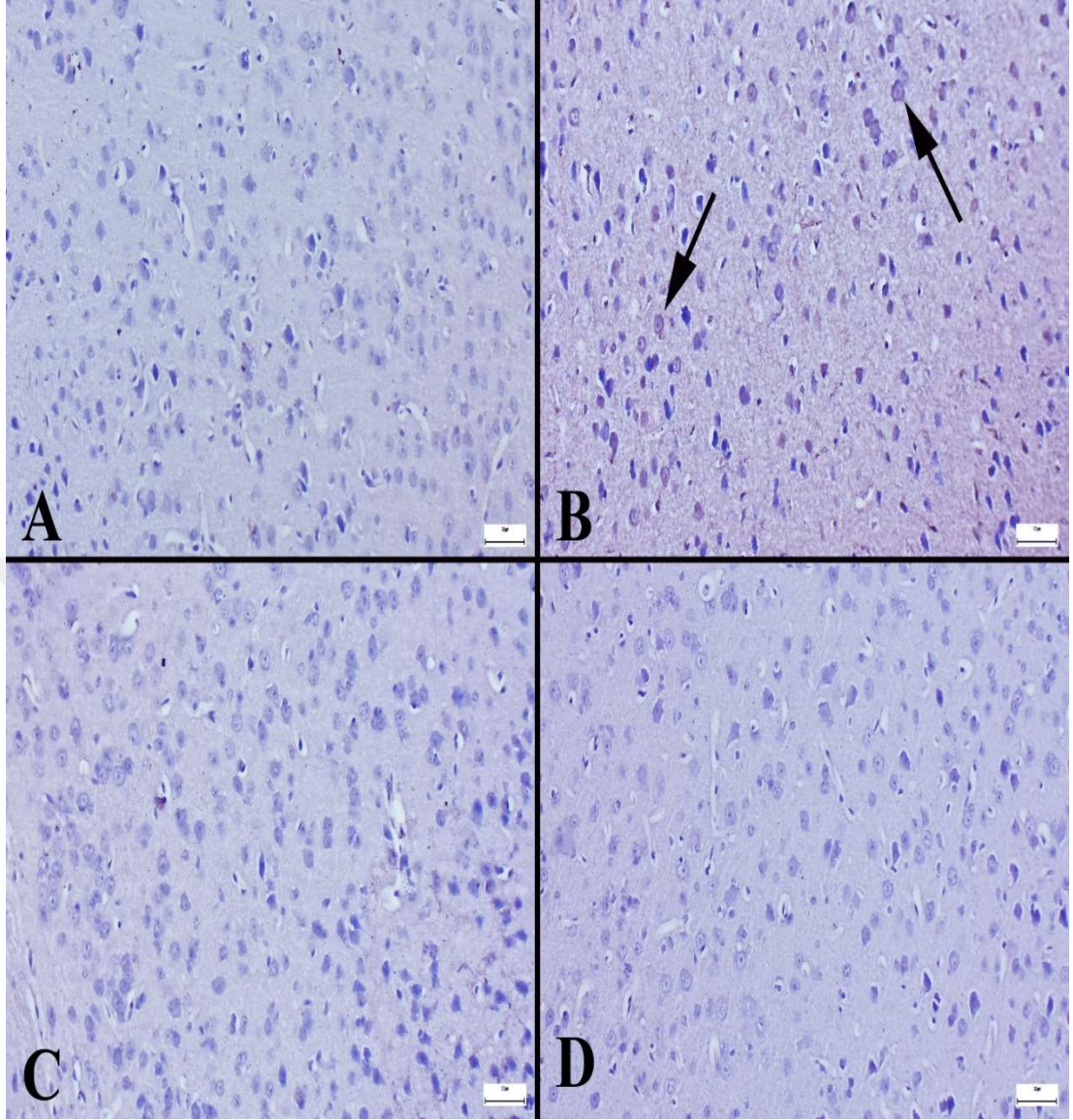
Kaspas-9 ekspresyonlarının gruplar arasındaki immunoreaksiyonları değerlendirildiğinde kontrol grubundaki farelerde organlarda negatif veya çok hafif ekspresyonlar dikkati çekti. Fipronil uygulamaları ekspresyonların belirgin şekilde artmasına sebep oldu. Malvidin tedavileri ekspresyonların azaltılmasında oldukça etkili bulundu. Malvidinin tek başına verildiği gruptaki organlarda ekspresyonlarda artma gözlenmedi (Şekil 4.25-4.29). İmmunohistokimyasal olarak pozitif hücre yüzdesinin istatistik analiz bulguları Tablo 4.10.'da verilmiştir.



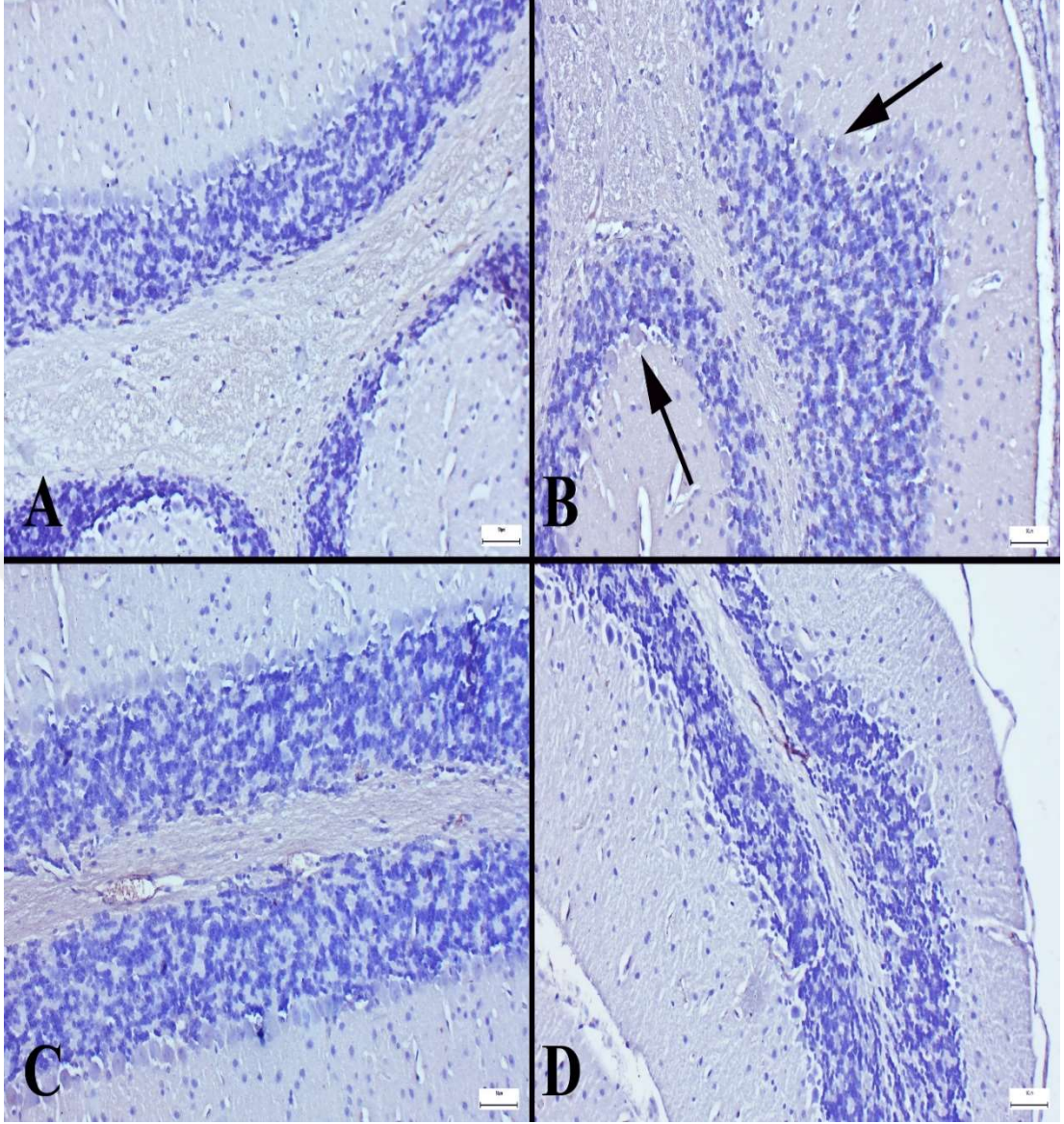
Şekil 4.25. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda hepatositlerde negatif ekspresyon. (D) Malvidin (MLV) grubunda hepatositlerde negatif ekspresyon, Streptavidin Biyotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



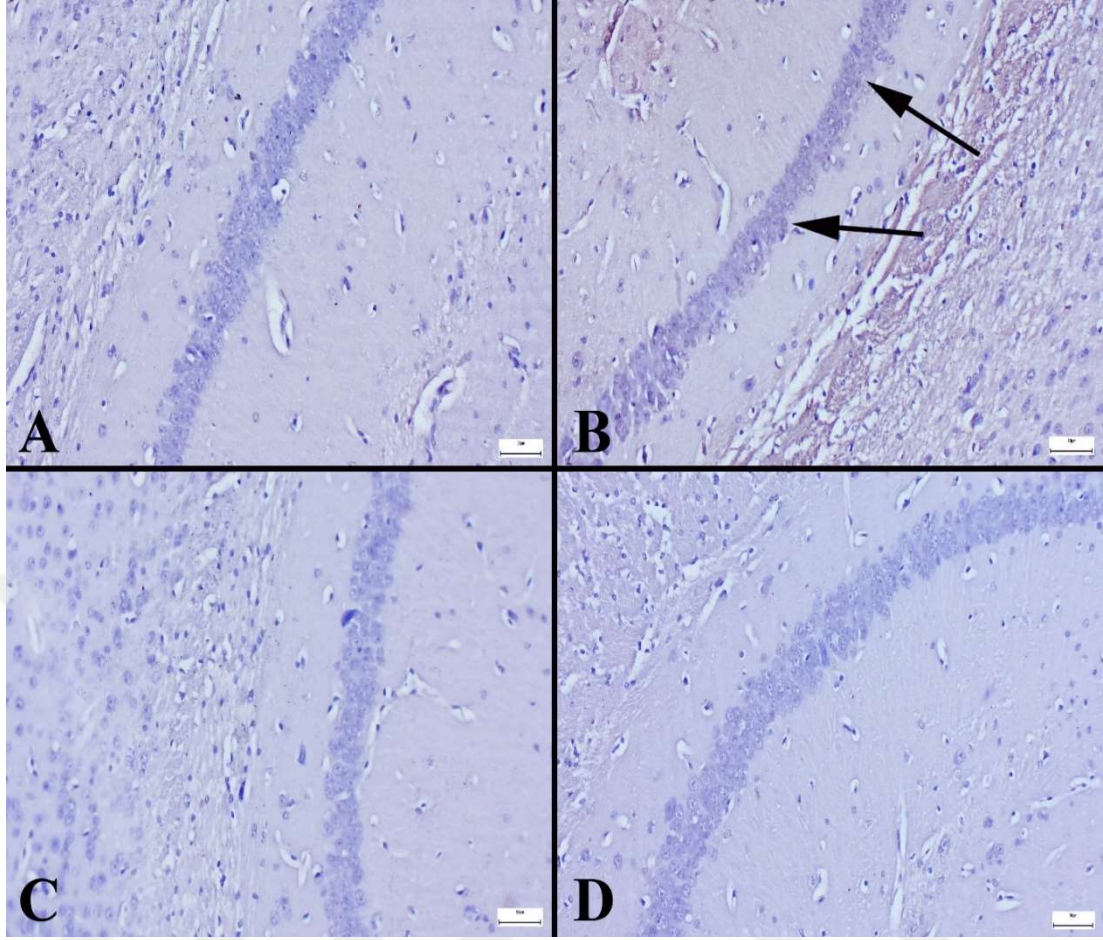
Şekil 4.26. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.27. Araştırma gruplarının beyin dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif kaspaz-9 ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.28. Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif kaspaz-9 ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda Purkinje hücrelerinde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda azalmış ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.29. Araştırma gruplarının hipokampüsdokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif ekspresyonlar. (B) Fipronil (FPN) grubundaki nöronlarda artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.

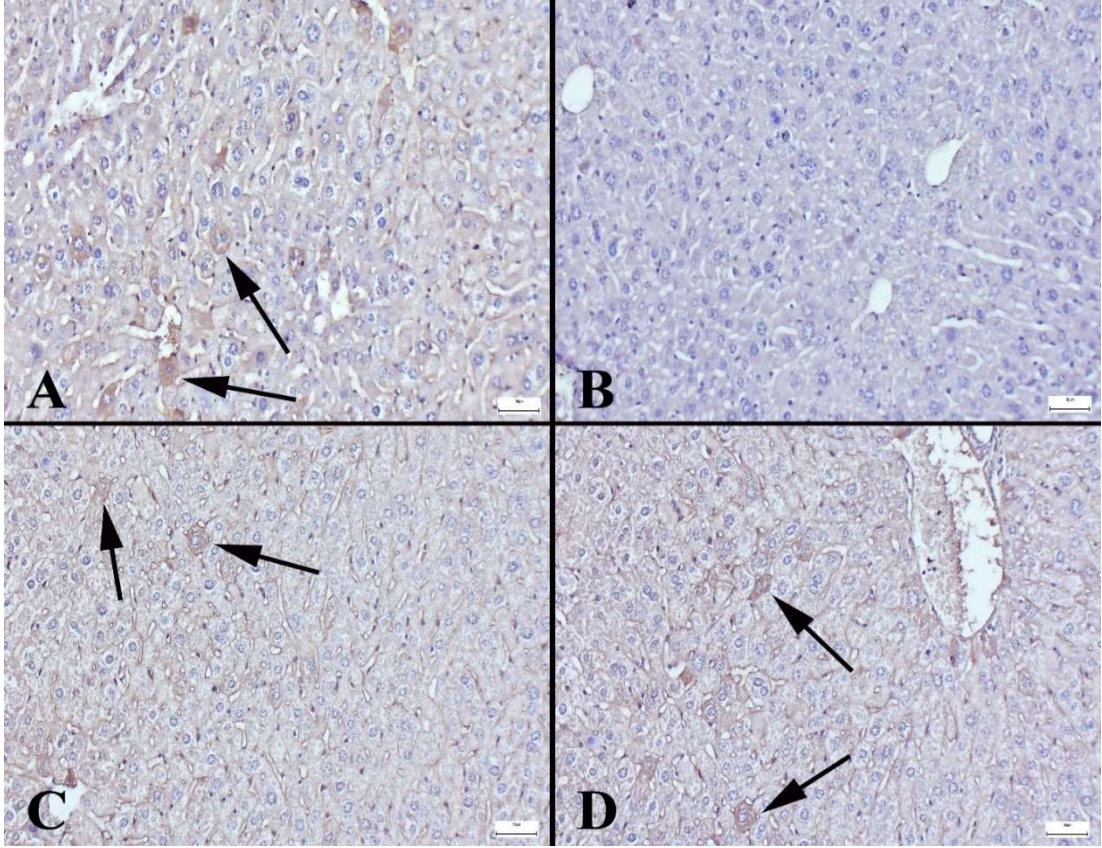
Tablo 4.10. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) dokulardaki kaspaz-9 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi.

Dokular	Gruplar				p değeri
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+ FPN	
Karaciğer	1,11±0,61 ^a	0,87±0,44 ^a	16,22±1,30 ^b	1,00±0,57 ^a	<0,001
Böbrek	1,11±0,56 ^a	0,25±0,16 ^a	22,66±3,27 ^b	1,33±0,66 ^a	<0,001
Beyin	1,11±0,51 ^a	0,37±0,26 ^a	15,44±1,33 ^b	1,11±0,56 ^a	<0,001
Beyincik	0,77±0,40 ^a	0,50±0,26 ^a	9,55±1,01 ^b	0,77±0,40 ^a	<0,001
Hipokampus	1,22±0,43 ^a	0,25±0,70 ^a	7,11±0,47 ^b	1,44±0,62 ^a	<0,001

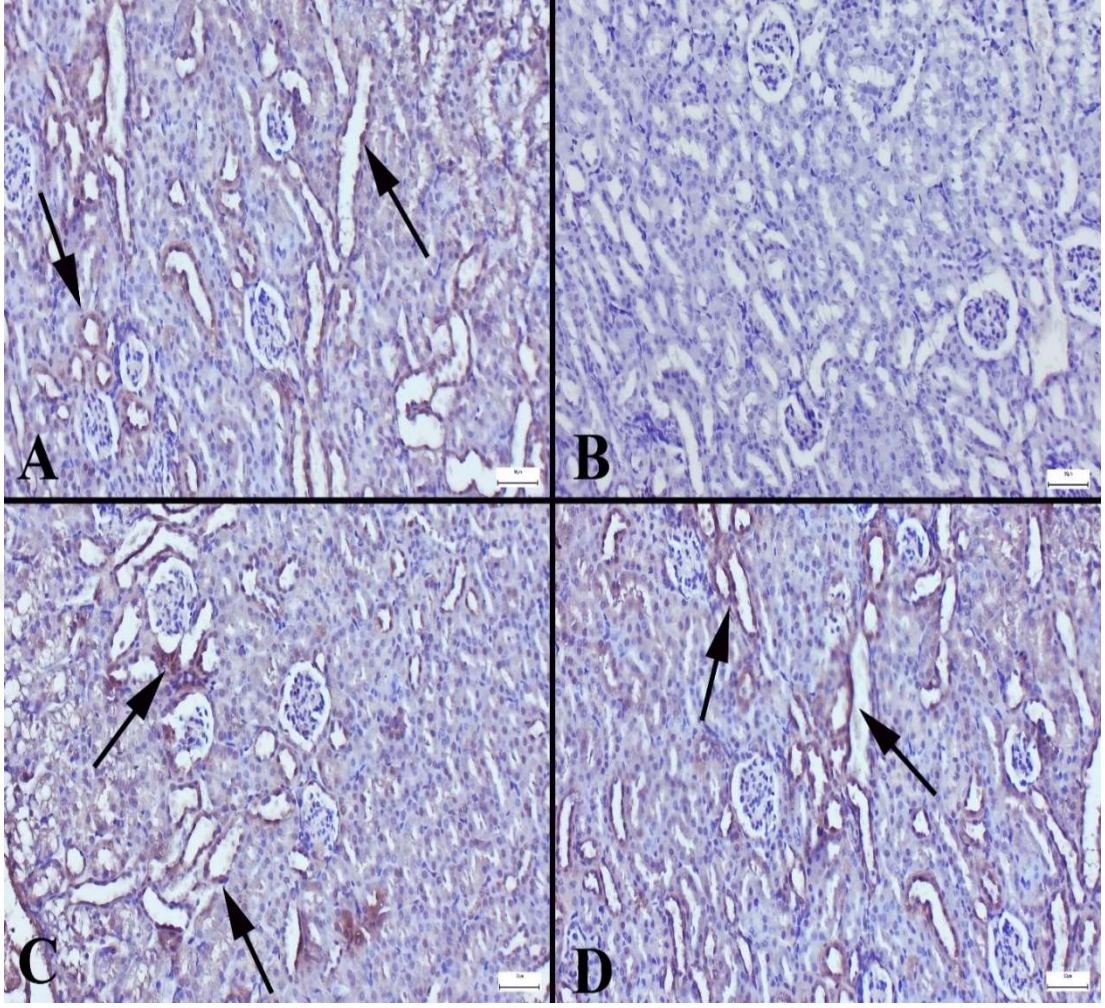
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a, b. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

4.5.3. Bcl-2 İmmunohistokimyasal Bulguları

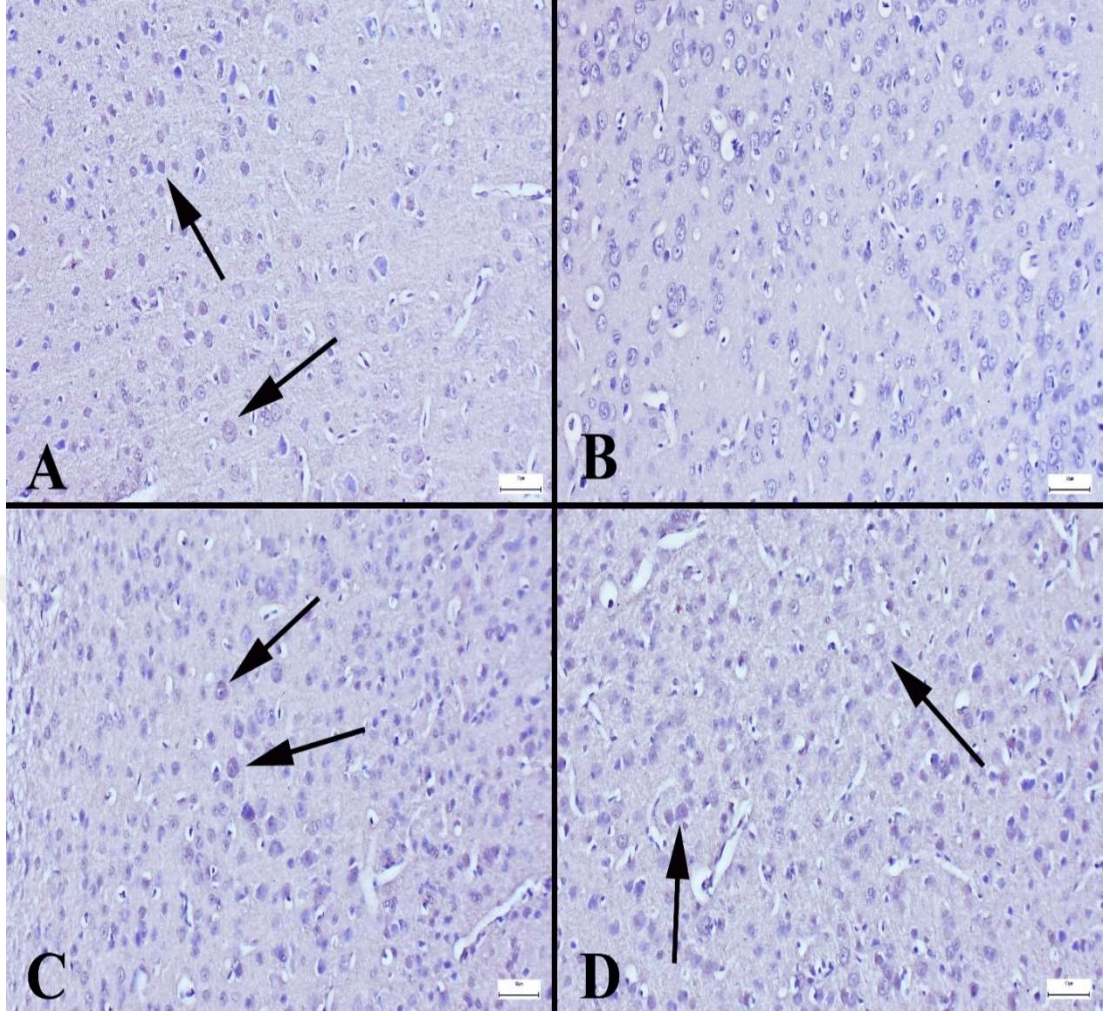
Anti-apoptotik özellikteki Bcl-2 primer antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyanan beyin korteksi, beyincik, hipokampus, karaciğer ve böbrek kesitlerinin incelenmesinde kontrol grubunda belirgin olan ekspresyonların fipronil grubundaki farelerin organlarında belirgin şekilde azaldığı dikkati çekti. Malvidin uygulamasının ise malvidin ve fipronilin beraber uygulandığı grupta ekspresyonları belirgin şekilde arttırdığı gözlemlendi. Malvidinin tek başına uygulandığı grupta da Bcl-2 ekspresyonlarında artışa sebep olduğu görüldü (Şekil 4.30-4.34). İmmunohistokimyasal olarak pozitif hücre yüzdesinin istatistik analiz bulguları Tablo 4.11.'de verilmiştir.



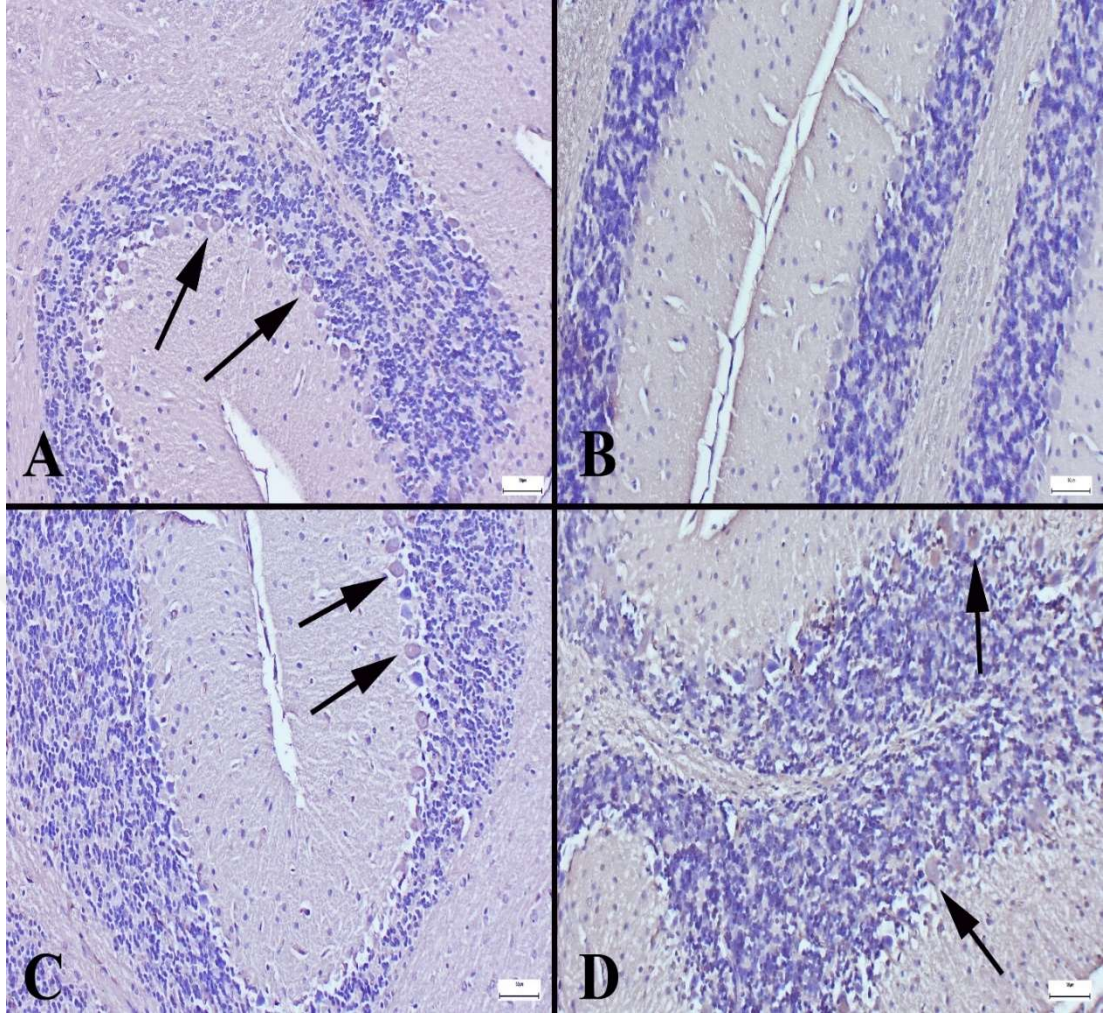
Şekil 4.30. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda hepatositlerde belirgin ekspresyonlar (oklar). (B) Fipronil (FPN) grubunda negatif ekspresyon. (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda hepatositlerde artmış ekspresyonlar (oklar). (D) Malvidin (MLV) grubunda hepatositlerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



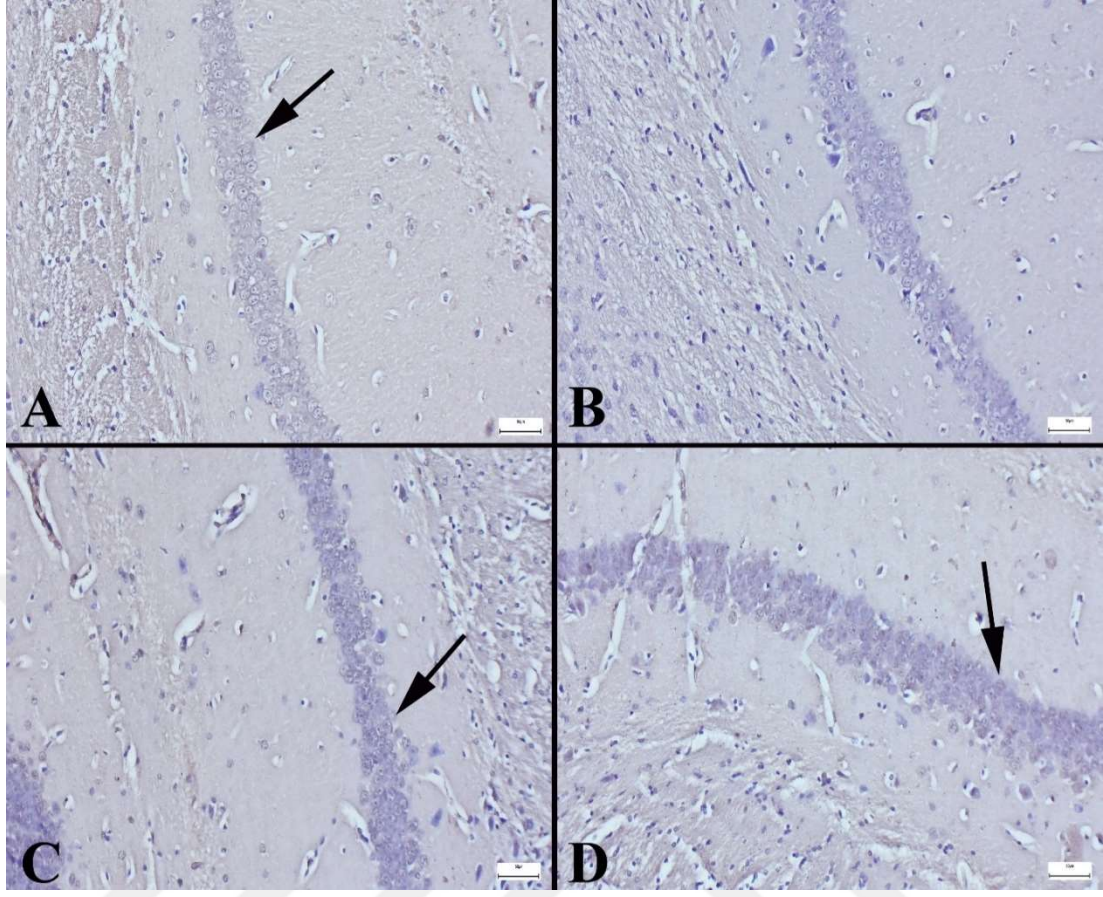
Şekil 4.31. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda özellikle böbrek tubul epitellerinde belirgin ekspresyonlar (oklar). (B) Fipronil (FPN) grubunda negatif ekspresyon. (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda tubul epitellerinde belirgin olmak üzere artmış ekspresyonlar (oklar). (D) Malvidin (MLV) grubunda tubullerde belirgin ekspresyonlar (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.32. Araştırma gruplarının beyin dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda orta düzeyde ekspresyonlar (oklar). (B) Fipronil (FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda artmış ekspresyonlar (oklar). (D) Malvidin (MLV) grubunda orta düzeyde ekspresyonlar (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.33. Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda beyincığın Purkinje hücrelerinde belirgin ekspresyonlar (oklar). (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin derecede azalmış ekspresyonlar. (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda Purkinje hücrelerinde artmış ekspresyonlar (oklar). (D) Malvidin (MLV) grubunda Purkinje hücrelerinde orta düzeyde ekspresyonlar (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.34. Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait Bcl-2 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda orta şiddette ekspresyonlar (ok). (B) Fipronil (FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda nöronlarda artmış ekspresyonlar (ok). (D) Malvidin (MLV) grubunda nöronlarda orta düzeyde ekspresyonlar (ok), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.

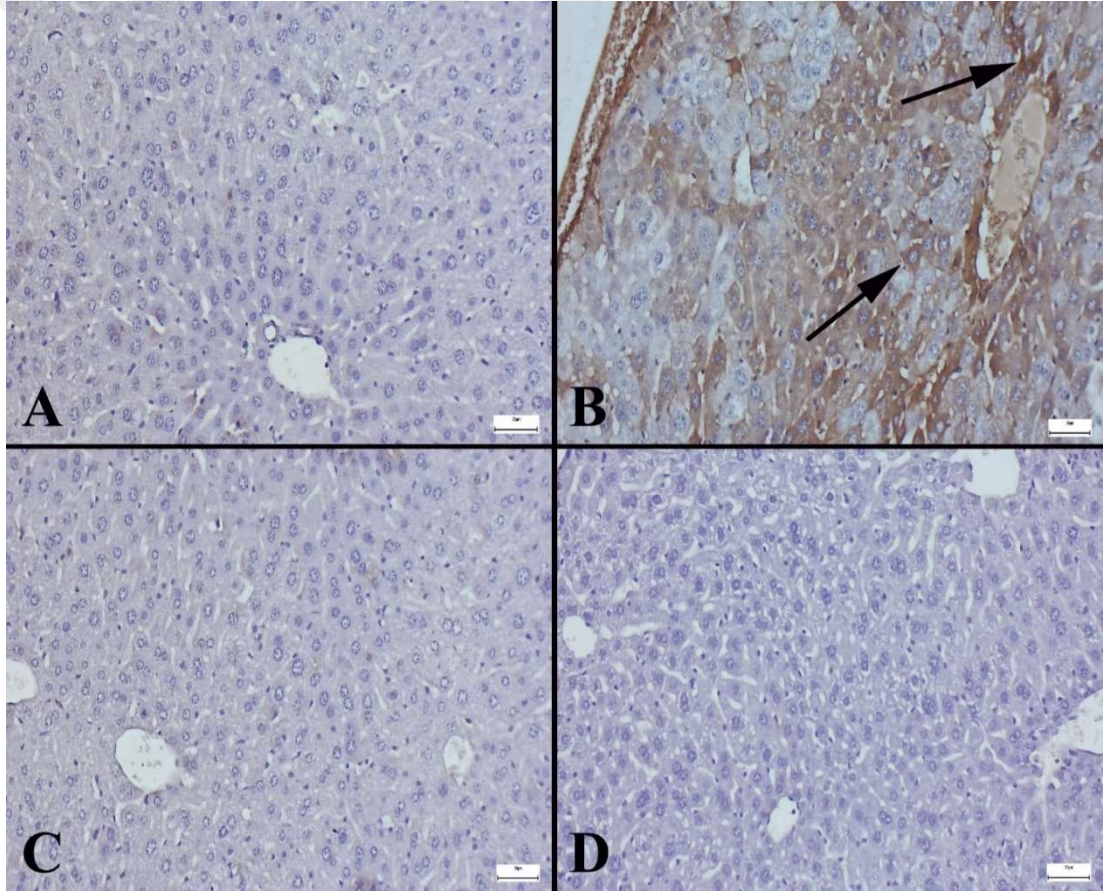
Tablo 4.11. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) dokulardaki Bcl-2 immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi.

Dokular	Gruplar				p değeri
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+ FPN	
Karaciğer	16,00±3,20 ^a	19,00±3,20 ^b	1,77±0,66 ^c	8,88±0,78 ^d	<0,001
Böbrek	20,66±1,73 ^a	27,00±1,41 ^a	2,77±2,68 ^b	13,44±2,60 ^c	<0,001
Beyin	15,88±1,76 ^a	20,50±1,51 ^b	1,66±1,11 ^c	9,88±1,05 ^d	<0,001
Beyincik	20,55±1,23 ^a	24,75±1,98 ^b	10,44±1,50 ^c	15,66±3,08 ^d	<0,001
Hipokampus	9,33±0,86 ^a	15,00±1,92 ^b	0,33±0,16 ^c	8,55±1,23 ^a	<0,001

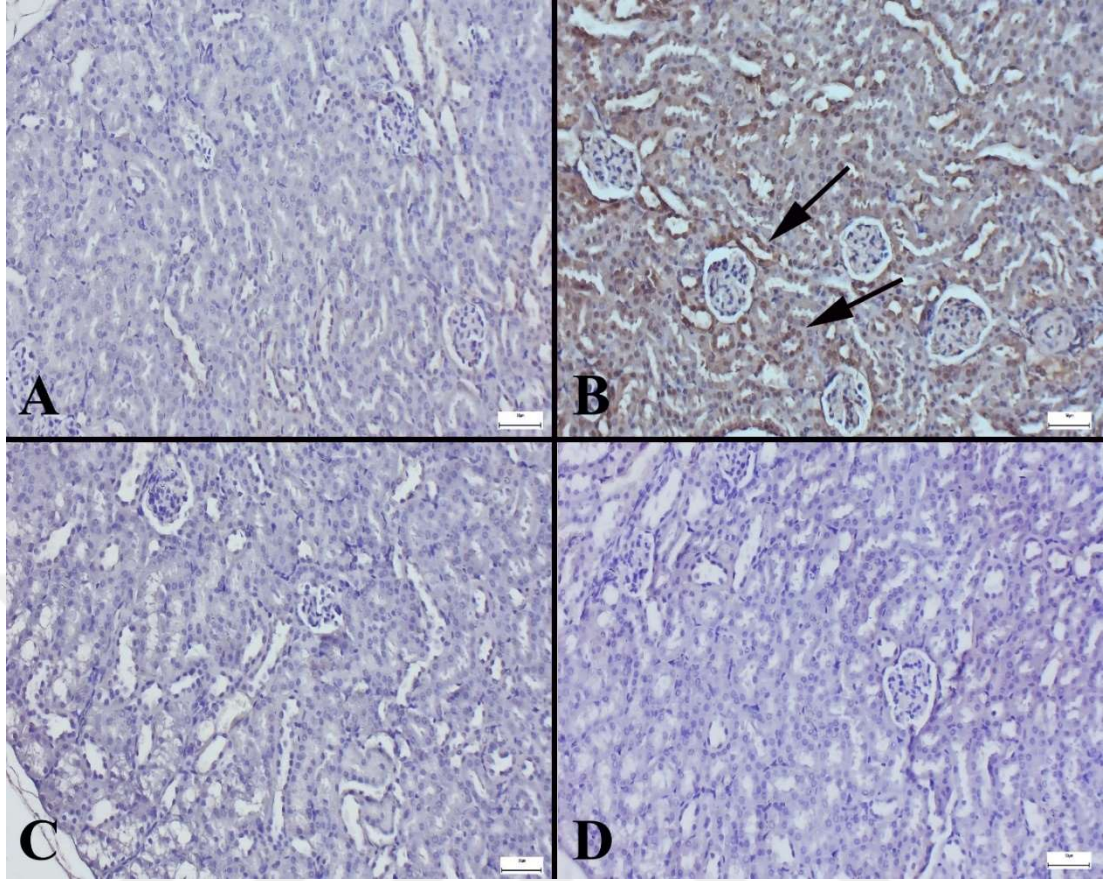
Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a, b, c, d. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.

4.5.4. Bax İmmunohistokimyasal Bulguları

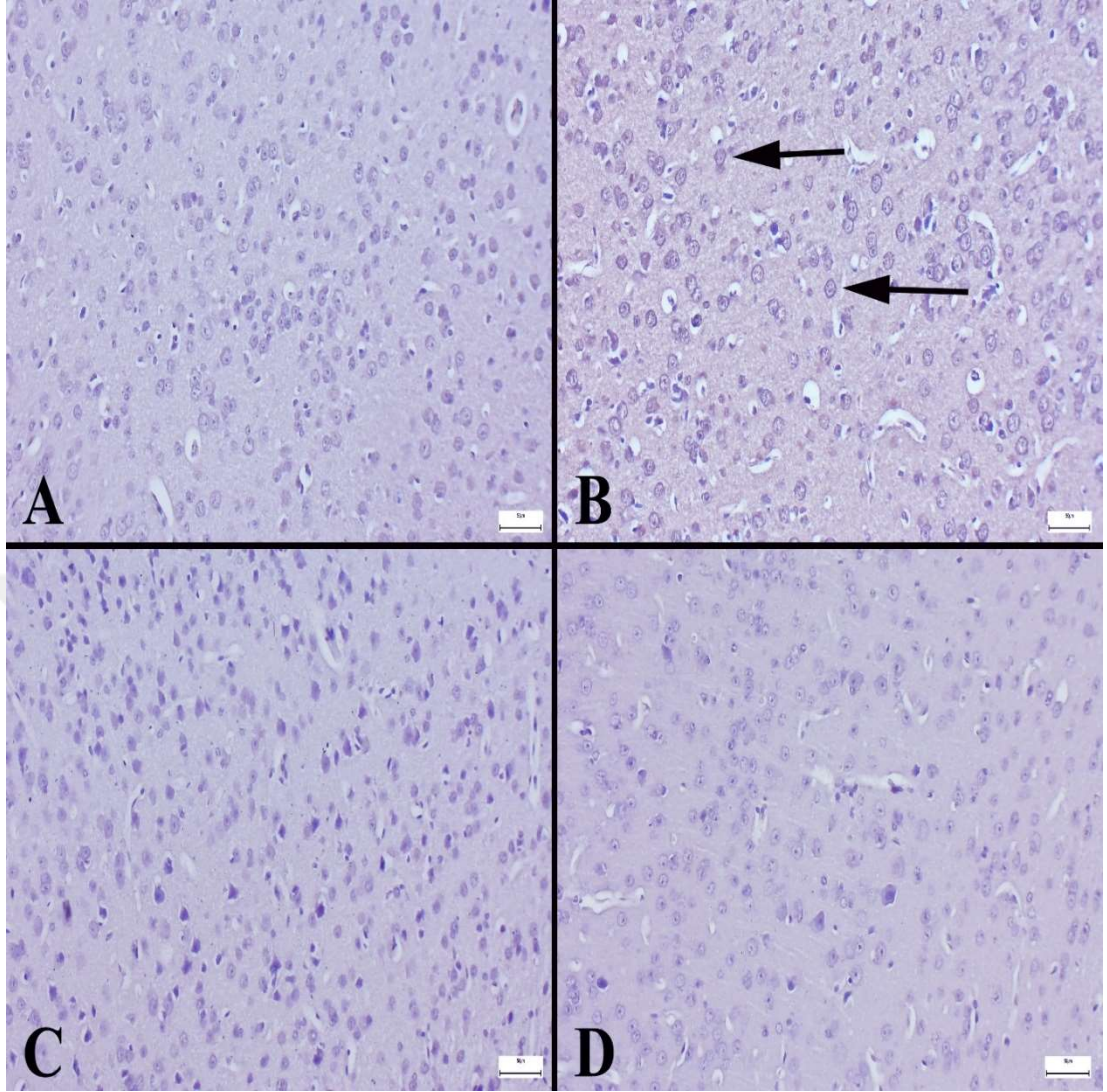
Gruplara göre beyin korteksi, beyincik, hipokampus, karaciğer ve böbreklerin Bax immunoekspresyonları incelendiğinde kontrol grubundaki farelerde çok hafif veya negatif olan ekspresyonların Fipronil grubunda belirgin şekilde arttığı saptandı. Malvidin uygulamasının malvidin ve fipronilin beraber verildiği grupta ekspresyonları belirgin şekilde arttırdığı gözlemlendi. Malvidin grubundaki farelerde Bax ekspresyonlarının çoğunlukla negatif olduğu dikkati çekti (Şekil 4.35-4.39). İmmunohistokimyasal olarak pozitif hücre yüzdesinin istatistik analiz bulguları Tablo 4.12.'de verilmiştir.



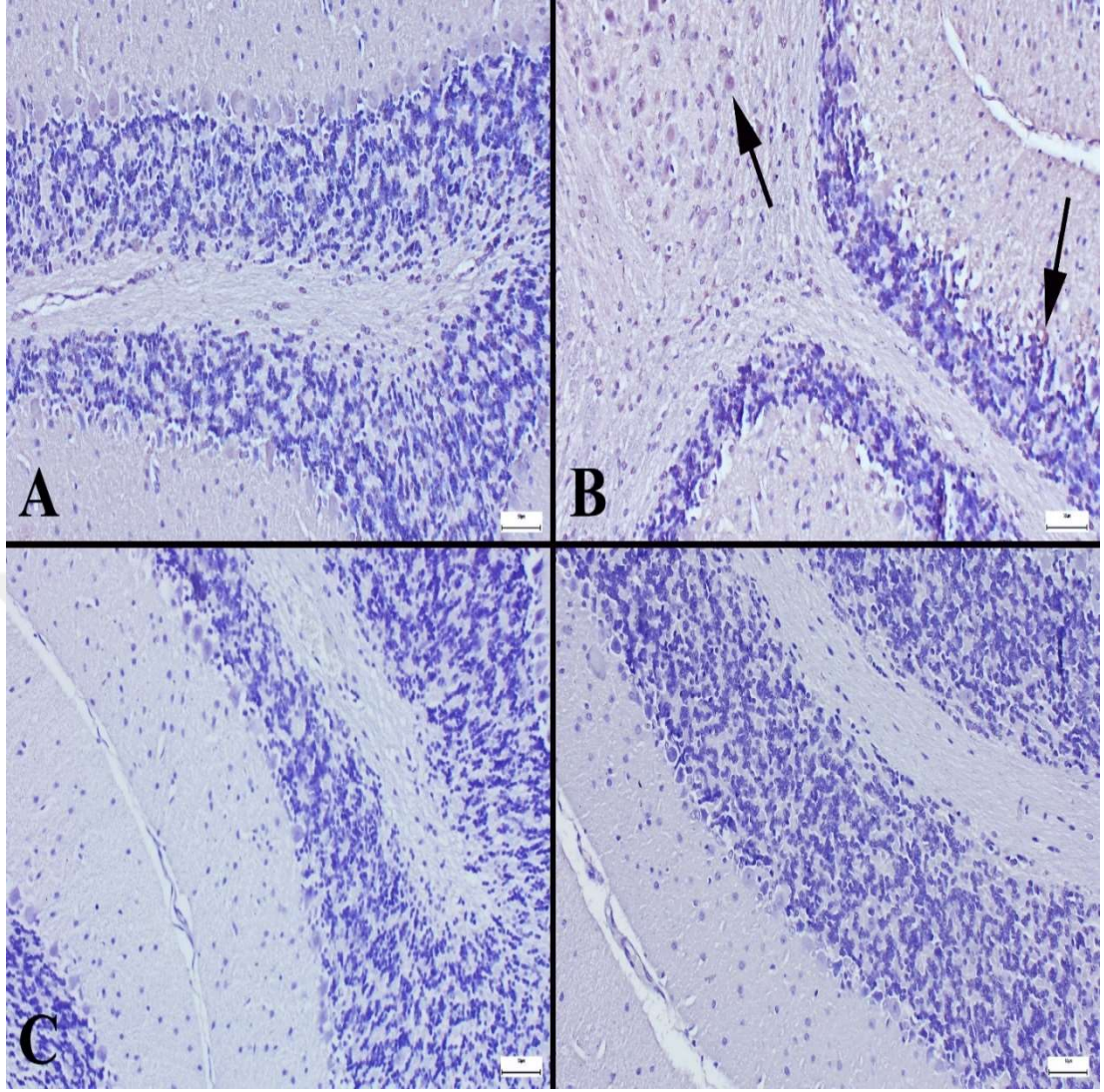
Şekil 4.35. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri. (A) Kontrol grubunda karaciğerde negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda bir farenin karaciğerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+ FPN) grubunda hepatositlerde belirgin şekilde azalmış ekspresyon. (D) Malvidin (MLV) grubunda hepatositlerde negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



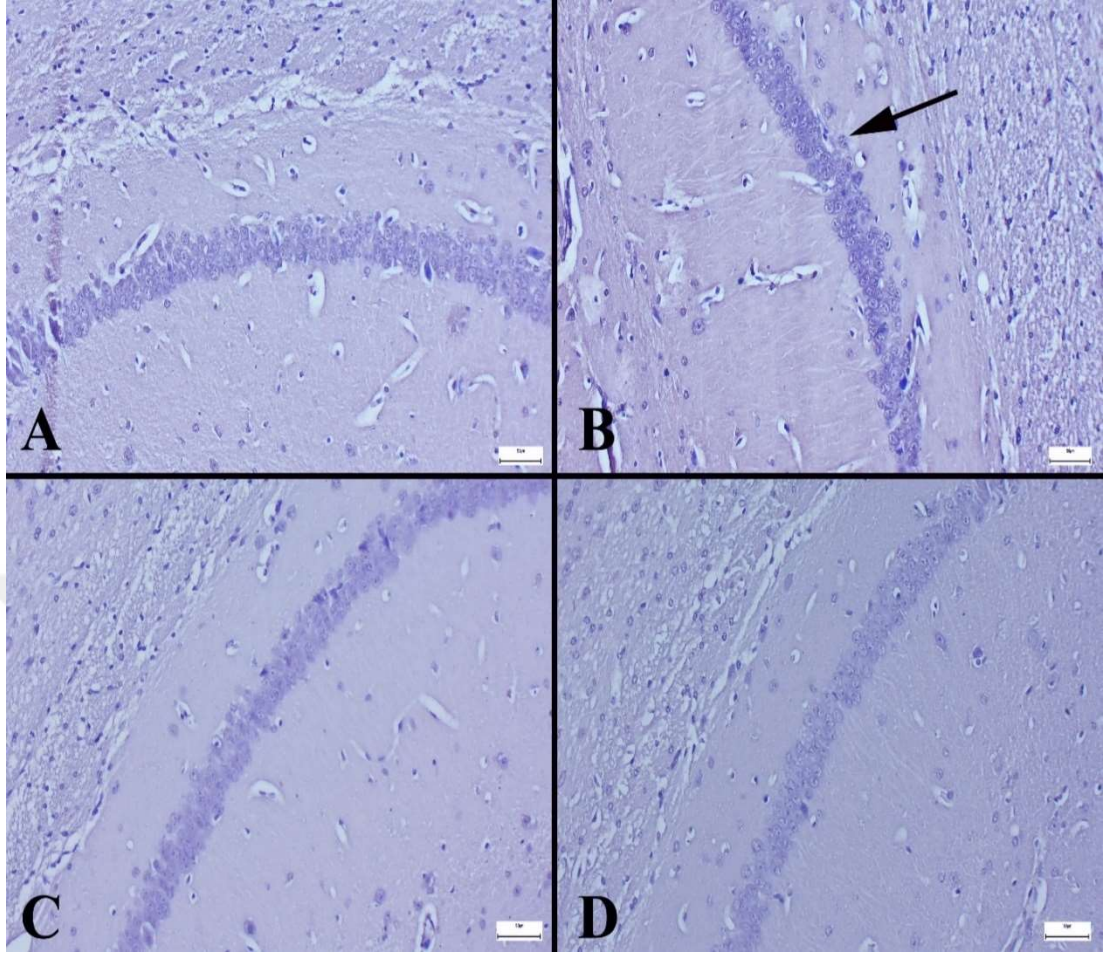
Şekil 4.36. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.37. Araştırma gruplarının beyin dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif Bax ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda belirgin ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.38. Araştırma gruplarının beyincik dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif Bax ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda Purkinje hücrelerinde ve diğer nöronlarda belirgin ekspresyonlar (oklar). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.



Şekil 4.39. Araştırma gruplarının hipokampus dokularına ait Bax ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri. (A) Kontrol grubunda nöronlarda negatif Bax ekspresyonları. (B) Fipronil (FPN) grubunda nöronlarda artmış ekspresyonlar (ok). (C) Malvidin+Fipronil (MLV+FPN) grubunda negatif ekspresyonlar. (D) Malvidin (MLV) grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.

Tablo 4.12. Fipronil (FPN), malvidin (MLV) ve kombinasyonlarının (MLV+FPN) dokulardaki Bax immunopozitif hücre sayılarının istatistiksel analizi.

Dokular	Gruplar				p değeri
	Kontrol	MLV	FPN	MLV+ FPN	
Karaciğer	1,66±0,57 ^a	0,50±0,32 ^a	26,88±2,36 ^b	2,00±0,70 ^a	<0,001
Böbrek	1,55±0,78 ^a	0,50±0,26 ^a	31,00±1,80 ^b	2,11±0,91 ^a	<0,001
Beyin	1,22±0,54 ^a	1,88±0,67 ^a	19,11±1,45 ^b	1,00±0,42 ^a	<0,001
Beyincik	1,00±0,44 ^a	0,50±0,26 ^a	20,55±2,92 ^b	1,55±0,52 ^a	<0,001
Hipokampus	1,00±0,32 ^a	0,75±0,31 ^a	7,77±2,33 ^b	0,55±0,24 ^a	<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a, b. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ($p<0,001$).

5. TARTIŞMA

Fipronil, tarım ve veterinerlik faaliyetlerinde yaygın olarak kullanılan bir fenilpirazol insektisittir (Tingle ve ark., 2003). İnsanlarda toksisite, üretici tarafından önerilen dozun aşılması veya uygun olmayan kullanım nedeniyle meydana gelebilir (Anadon ve Gupta, 2012). Ayrıca fipronil tarımda kullanıldığında biyobirikim etkisine sahiptir; dolayısıyla besin zinciri yoluyla hayvanları ve insanları etkilemektedir (Qin ve ark. 2015). Fipronil hakkındaki halk sağlığı endişeleri, sıçanlarda tiroid kanserini belgeleyen raporlar sonrasında artmıştır (Hurley ve ark., 1998). Fipronil uygulandıktan sonra hızla metabolize olur ve özellikle yağ dokusu ve beyinde önemli miktarda metabolitlerin bir hafta boyunca kalıcılığını sürdürdüğü görülmüştür (Woodward, 2012). Fipronil, memeliler için orta derecede toksiktir ve sırasıyla sıçanlarda ve farelerde ağızdan öldürücü doz ($ÖD_{50}$) değerleri 97 ve 95 mg/kg c.a'dır (EPA, 1996). Bu çalışmada, farelerde 5 mg/kg c.a 14 gün boyunca ağızdan verilen fipronilin hepatotoksitesisi, nefrotoksitesisi ve nörotoksitesisi araştırılmıştır.

Son yıllarda, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere çoğu ülkede çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak yerel doğal ürünlerin kullanılma oranlarında önemli artışlar görülmüştür. Doğal ürünlere talebin artması sebebiyle ürünlerde bulunan aktif maddeler araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Antika ve Dewi, 2020; Fang, 2014). Özellikle doğal ürünlerdeki çeşitli biyoaktif bileşiklerin canlılar üzerinde çok yönlü etkileri vardır. Bu biyoaktif bileşiklerin en önemlileri arasında polifenolik yapıda bulunan maddeler yer alır. Polifenolik bileşiklerin önemli üyelerinden biri flavonoidlerdir. Antosiyaninler, flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir ve flavilyum katyonları oluşturma kapasiteleri nedeniyle diğer flavonoidlerden ayrılırlar (Harborne, 1998). Antosiyaninlerin önemli bir üyesi olan malvidinin antioksidan, yangı ve kanser önleme ile nöroprotektif etkileri başta olmak üzere birçok farmakolojik özellikleri bulunmaktadır ve bu özellikler *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Dai ve ark., 2017; Decendit ve ark., 2013; Fagundes ve ark., 2021; Sakthivel ve ark., 2020; Wei ve ark., 2017).

Karaciğer, böbrek ve beyin fipronilin ana hedef organlarıdır (Abdel- Daim ve ark., 2018; Abd Eldaim ve ark., 2020; Abou-Zeid ve ark., 2021; Awad ve ark., 2021; Badgujar ve ark., 2015; Badgujar ve ark., 2016). Bu çalışmada fipronil ile indüklenen karaciğer, böbrek ve beyin hasarına karşı malvidinin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Farelere 14 gün boyunca ağızdan 5 mg/kg c.a verilen fipronilin oksidan/antioksidan dengesi önemli ölçüde değiştirdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda karaciğer, böbrek ve beyin dokularında fipronil verilen grupta, kontrol grubuna göre SOD, CAT ve GPx enzim etkinlikleri ile GSH düzeylerinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); MDA düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Endojen antioksidan sistem, hücrelerin ROS'un zararlı etkilerine karşı savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu sistem, hücresel sağlığı sürdürmek ve oksidatif strese karşı direnç sağlamak için gereklidir (Boussabbeh ve ark., 2016a). Hücrelerde ROS'un zararlı etkilerine karşı ilk savunma hattını SOD oluşturmaktadır. Bu enzim, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oksijen ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi daha az zararlı maddelere kataliz yaparak ROS'u etkisiz hale getirir (Jayashree ve ark., 2017). Hidrojen peroksit, O_2 .- göre daha az zararlı bir serbest radikaldir; CAT veya GPx enziminin varlığında suya ve moleküler oksijene dönüştürülür. Bu enzimler, hücrelerin oksidatif strese karşı savunmasında önemli rol oynar (Glaser ve Stopper, 2012; Olsvik ve ark., 2005). Glutatyon, hücresel antioksidan savunmada önemli rol oynayan bir tripeptit olan sistein, glutamin ve glisinden oluşan bir düşük molekül ağırlıklı tiyol grubu içeren bir bileşiktir. Redoks homeostazının sürdürülmesinde büyük öneme sahiptir ve serbest radikallerle reaksiyona girerek okside olur, böylece oksitlendiğinde glutatyon disülfid (GSSG) ve diğer disüflitlere dönüşür (Miller ve Schmidt, 2020). Doymamış yağ asitlerinin yükseltgenmesi sonucu oluşan MDA, lipid peroksidasyonun bir göstergesidir (Wang ve ark., 2018). Oksidatif stres, fipronilin toksik etkilerinin oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Fipronil, hücresel oksidan/antioksidan dengesini bozarak, nükleik asitler, lipidler ve proteinler dahil olmak üzere hücresel makromoleküllere zarar vererek hücresel oksidatif hasara yol açmaktadır (Salminen ve Paul, 2014). Ayrıca fipronilin mitokondriyal solunum zinciri ve kalsiyum homeostazını baskılaması, oksidatif ve nitrozatif stresin yanı sıra nükleik asitler ve proteinlere zarar vererek karaciğer, böbrek ve beyin gibi hayati organlar üzerinde toksik etkiler yarattığı bildirilmiştir (Gupta ve Anadon, 2018).

Fipronilin omurgalılar üzerindeki nörotoksik, hepatotoksik, nefrotoksik etkilerinin ROS oluşumu sonucu meydana geldiği *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Abdel- Daim ve ark., 2018; Abd Eldaim ve ark., 2020; Abou-Zeid ve ark., 2021; Awad ve ark., 2021; Badgujar ve ark., 2015; Badgujar ve ark., 2016; Bakr ve ark., 2022; Bal ve ark., 2022; El-Ballal ve ark., 2019; Elgawish ve ark., 2019; Elshony ve ark., 2021; Hossam El Din ve ark., 2022; Khalaf ve ark., 2020; Sakr ve ark., 2022; Sayed ve ark., 2019). Abdel- Daim ve ark. (2018), oksidatif hasarı ağızdan 28 gün boyunca 10 mg/kg dozda fipronil ile indükledikleri çalışmada, sıçanlarda fipronilin MDA seviyelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) yükselttiğini böbrek, beyin ve karaciğerde GSH düzeylerini, SOD, CAT ve GPx enzimlerinin aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) azalttığını belirtmişlerdir. Abd Eldaim ve ark. (2020), yaptıkları başka bir araştırmada sıçanlara 4,85 mg/kg dozunda oral olarak 6 hafta boyunca fipronil uygulamışlar; hepatik ve renal dokularda MDA seviyesinde artış ile GSH ve CAT aktivitelerinde önemli ölçüde ($p<0,05$) düşüş tespit etmişlerdir. Abou-Zeid ve ark. (2021), sıçanlara 28 gün boyunca fipronil (9,7 mg/kg, oral) uyguladıkları çalışmada karaciğer ve böbrekte histomorfolojik değişikliklerle birlikte hepatorenal toksik etkilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca karaciğer, beyin ve böbrekte GSH seviyesi ($p\leq 0,05$) ile SOD ve CAT aktivitelerinde ($p\leq 0,05$) düşüş ile birlikte MDA seviyesinde ($p\leq 0,05$) artış tespit etmişlerdir. Awad ve ark. (2021) ise 45 gün boyunca ağızdan 10 mg/kg dozda fipronil uyguladıkları sıçanlarda MDA düzeyinin önemli ölçüde ($p\leq 0,05$) arttığını bildirmişlerdir. Badgujar ve ark. (2015), fareleri 28 gün boyunca farklı dozlarda fipronile oral olarak sırasıyla 2,5; 5 ve 10 mg/kg dozda maruz bıraktıkları çalışmada özellikle artan dozlarda hem böbrek hem de beyin dokularında lipid peroksidasyonunda önemli bir ($p<0,05$) artış ile SOD ve CAT etkinliği ile GSH düzeylerinde önemli ölçüde ($p<0,05$) düşüşe neden olduğunu vurgulamışlardır. Badgujar ve ark. (2016), aynı metodla yaptıkları başka bir çalışmada da, karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunda artışa ($p<0,05$); SOD, CAT ve GST etkinliğinde ($p<0,01$) ve GSH düzeylerinde önemli derecede ($p<0,01$) azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bakr ve ark. (2022), sıçanlarda fipronil (13,277 mg/kg, oral, 28 gün boyunca) ile indükledikleri beyin hasarında MDA ile enzimatik antioksidan aktivitelerinde (SOD, CAT ve GPx) önemli bir ($p<0,05$) artış tespit etmişlerdir. Bal ve ark. (2022), 7 gün boyunca farelerde 25 mg/kg fipronil

uygulamasının karaciğer dokusunda LPO aktivitesinde önemli ($p<0,05$) artışa, SOD ve CAT aktivitelerinde ise düşüşe ($p<0,05$) neden olduğunu saptamışlardır. El-Ballal ve ark. (2019), sıçanlara 9,7 mg/kg dozda oral olarak haftada 3 defa olacak şekilde 8 hafta boyunca fipronil uygulamışlar, karaciğer ve böbrek dokularındaki MDA düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) ile GSH düzeyi ve CAT aktivitesinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) görüldüğünü belirtmişlerdir. Elgawish ve ark. (2019), sıçanlara 6 hafta boyunca 9,7 mg/kg ağızdan fipronil uyguladıkları çalışmalarında karaciğer homojenatında ölçtükleri fipronil uygulanan grubun MDA seviyelerinde önemli bir artış ($p<0,0001$) olduğunu vurgulamışlardır. Elshony ve ark. (2021), sıçanlarda 28 gün boyunca fipronil (5 mg/kg, oral) uygulayarak oluşturdukları nöronal disfonksiyonda MDA seviyelerinde artma ile SOD ve GPx aktivitelerinde önemli bir ($p\leq 0,05$) azalma olduğunu bildirmişlerdir. Hossam El Din ve ark. (2022), sıçanlara farklı dozlarda (3,31 mg/kg c.a ve 6,68 mg/kg c.a 28 gün boyunca) fipronil uygulamasının karaciğer ve böbrekteki MDA ile lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde ($p<0,05$) artırdığını, GSH düzeyi ve CAT ile SOD etkinliklerini önemli bir şekilde ($p<0,05$) azalttığını belirtmişlerdir. Khalaf ve ark. (2020), sıçanlarda fipronil (10,5 mg/kg) ile indükledikleri böbrek ve karaciğer hasarında MDA seviyesinde yükselme ($p\leq 0,05$), SOD ve CAT aktiviteleri ve GSH seviyelerinde ise belirgin şekilde ($p\leq 0,05$) düşüş bildirmişlerdir. Sakr ve ark. (2022), sıçanlara 90 gün boyunca ağızdan fipronil (4,8 mg/kg/c.a.) uyguladıkları çalışmalarında böbrek dokusundaki oksidatif stres biyobelirteçlerini incelemişler, MDA ve GSH seviyelerinde artış CAT ile GPx aktivitelerinde düşüş ($p<0,001$) şekillendiğini tespit etmişlerdir. Sayed ve ark. (2019), fipronil (13,277 mg/kg, oral) ile sıçanlarda subakut toksisite oluşturdukları çalışmada fipronilin karaciğer MDA seviyeleri ve SOD, CAT, GPx enzimatik aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,05$) artırdığını vurgulamışlardır. Seif ve ark. (2021), sıçanlara fipronil periton içi olarak (10 mg/kg/c.a.) uyguladıkları çalışmada hepatik oksidatif stres belirteçlerinden MDA seviyelerinde önemli bir artış ($p<0,05$) ile SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmada da diğer araştırmalara benzer şekilde fipronil dokularda MDA düzeylerinde artışa neden olarak lipid peroksidasyona yol açtığı, antioksidan savunma sistemini etkileyerek (GSH düzeyi ile SOD, CAT, GPx etkinliğinde düşüş) oksidatif hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada

malvidin+fipronilin birlikte verildiği grupta fipronilin tek başına verildiği gruba göre GSH düzeyi ile SOD, CAT, GPx etkinliğinde önemli artış ($p<0,05$); MDA düzeyinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) belirlenmiştir. Farklı ajanlarla indüklenen oksidatif hasara karşı malvidinin koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Daha önce yapılan *in vivo* araştırmalar bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir (Wei ve ark., 2017; Zheng ve ark., 2021). Wei ve ark. (2017), malvidinin (100 ve 200 mg/kg, oral), izoproterenol ile uyarılan kardiyak nekroz modelinde CAT, SOD ve GPx aktivitelerini arttırdığını ve lipid peroksidasyonu azalttığını vurgulamışlardır. Zheng ve ark. (2021), oksidatif hasar oluşturdıkları farelerde 35 gün boyunca farklı malvidin formlarını içeren kompozisyon (50 mg/kg c.a) uygulamasının SOD, GPx, CAT aktivitelerini önemli ölçüde ($p<0,01$) arttırdığını, serum ve karaciğerdeki MDA seviyelerini önemli ölçüde ($p<0,01$) azalttığını tespit etmişlerdir.

8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) DNA oksidatif biyolojik belirteçidir ve DNA'daki guanin bazının hidroksil radikalleri tarafından 8-hidroksilasyonu sonucunda oluşur (Thompson ve ark., 1999; Xu ve ark., 2004). Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde fipronilin 8-OHdG seviyelerinde önemli bir artışa ($p<0,05$) yol açtığı tespit edilmiştir (Hossam El Din ve ark., 2022; Uçar ve ark., 2020; Uçar ve ark., 2022). Uçar ve ark. (2020), farklı dozlarda fipronil uygulamasının (0,05; 0,1 ve 0,2 mg/L) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) 8-OHdG seviyelerini ($p<0,05$) artırdığını belirtmişlerdir. Uçar ve ark. (2022), fipronilin farklı konsantrasyonlarının (0,05; 0,1 ve 0,2 mg/L) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) beyin dokusu üzerinde neden olduğu etkileri araştırdıkları diğer bir çalışmalarında ise konsantrasyona bağlı olarak 8-OHdG seviyesinde önemli bir artış ($p<0,05$) tespit etmişlerdir. Hossam El Din ve ark. (2022), sıçanlara 28 gün boyunca farklı dozlarda (3,31 mg/kg c.a ve 6,68 mg/kg c.a) fipronil uygulamasının 8-OHdG seviyelerinde önemli bir artışa ($p<0,05$) neden olduğunu bildirmişlerdir. Malvidinin güçlü antioksidan yapısı nedeniyle 8-OHdG seviyelerinde düşüşe yol açabileceği düşünülmektedir. Ramirez-Tortosa ve ark. (2001), sıçanları 2 ay boyunca %26 oranında malvidin-3-glikozid içeren antosiyanin bakımından zengin bir ekstrakt içeren rasyonla beslemişler ve karaciğerde 8-OHdG seviyelerinde önemli bir azalma ($p<0,001$) olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada fipronilin 8-OHdG

seviyelerinde neden olduğu artışlarda malvidin uygulaması ile önemli bir düşüş ($p<0,05$) tespit edilmiştir; fakat literatür taraması sonucu bu bulgularla ilgili başka araştırmalara rastlanılmamıştır.

Nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2, redoks homeostazının düzenlenmesinde ve birçok hücre koruyucu protein ve antioksidan genin ekspresyonunda önemli bir rol oynar (Bellezza ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2013). Antioksidan yanıt elemanı tarafından düzenlenen enzimler arasında SOD2, CAT, GPx, heme oksijenaz-1 (HO-1) ve GST gibi önemli enzimler bulunur (Itoh ve ark., 1997; Jaiswal, 2004). Nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2 ARE ile etkileşime girerek bu enzimlerin ekspresyonunu artırır, bu da hücrelerin serbest radikallerle mücadele etmelerine yardımcı olur. Bazal koşullar altında Nrf2, sistein açısından zengin baskılayıcı bir protein olan Kelch benzeri ECH'e bağlı protein-1 (Keap1) ile sitozolde etkisiz halde tutulur. Ancak, hücreler oksidatif stresle karşı karşıya kaldığında veya diğer uyarıcılara maruz kaldığında, Keap1-Nrf2 bağlantısı bozulur ve Nrf2 nükleusa geçer. Nükleusa geçen Nrf2, ARE'yi hedefleyerek antioksidan yanıt genlerinin ekspresyonunu artırır. Ayrıca Nrf2'nin yangıyı önleyici potansiyeli vardır ve yangıya neden olan sitokinlerin ve inflamatuvar moleküllerin üretimini azaltır, bu da hücrel yangının kontrol altına alınmasına yardımcı olur (Zhang ve ark., 2013). Fipronil sitotoksitesinin altında yatan en önemli nedenler arasında ROS'un aşırı üretimi ve hücrelerde redoks dengesinin bozulmasıdır. Hücrelerde ROS'un aşırı üretimi sonucu lipid peroksidasyon, protein oksidasyonu ve DNA hasarı meydana gelir (Wasef ve ark., 2021). Hücrelerdeki redoks dengesinin ve faz II detoksifikasyonunun ana düzenleyicisi olması sebebiyle Nrf2 fipronil toksisitesinden en çok etkilenen parametrelerden biridir (Loboda ve ark., 2016). Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde fipronilin Nrf2 düzeyini azalttığı ($p<0,05$) tespit edilmiştir (Kavitha ve ark., 2013; Sakr ve ark., 2022). Sakr ve ark. (2022), sıçanlarda fipronil (4,8 mg/kg/c.a. ağızdan 90 gün boyunca) ile nefrotoksite oluşturdukları çalışmalarında fipronil uygulamasının redoks dengesizliği ve yapısal hasara neden olarak Nrf2 düzeylerinde önemli bir ($p\leq 0,05$) azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Malvidinin öne çıkan özelliklerinden biri, Nrf2/Keap 1 sinyalini aktive etmesi ve oksidatif stresi

düzenlemek için sitoprotektif enzimleri yukarı regüle etmesidir (Kavitha ve ark., 2013). Bu araştırmada malvidin uygulamasının fipronilin azalttığı Nrf2 düzeylerinde önemli bir artışa ($p<0,05$) sebep olduğu tespit edilmiştir. Daha önce yapılan araştırmalar da bu bulguları desteklemektedir (Fan ve ark., 2022; Wei ve ark., 2017). Wei ve ark. (2017), malvidin (100 ve 200 mg/kg, oral) uygulamasının, izoproterenol ile uyarılan kardiyak nekrozda Nrf2'nin nükleer translokasyonunu teşvik ettiğini vurgulamışlardır. Fan ve ark., (2022), farelerde LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarında çeşitli dozlarda (5, 10 20 mg/kg/c.a.) malvidin uygulamasının Nrf2 protein ekspresyonunu önemli ölçüde ($p<0,001$) artırdığını ve malvidinin koruyucu etkisinin Nrf2 sinyal yolunu aktivasyonundan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Nükleer faktör kappa B tüm canlılarda her hücrenin sitoplazmasında inaktif halde bulunmaktadır ve organizmanın kendini savunmada kullandığı ana unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir. Nükleer faktör kappa B aktif hale geldiğinde bağışıklık ve yangısal yanıtlar, apoptoz, anjiyogenez, hücre döngüsü, hücre adezyonunda rol oynayan 400'den fazla genin ekspresyonunu düzenler. Ayrıca NF- κ B bakteriyel ve viral enfeksiyonlar ile otoimmün (bağışıklık-yangısal) hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın fizyopatolojisinde anahtar rol oynamaktadır (Strickland ve Ghosh, 2006). Yangısal süreçler birçok hastalığın ayırt edici özelliğidir ve NF- κ B, yangının başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayan yanıtların odak noktasıdır (Senftleben ve ark., 2001). Nükleer faktör kappa B'nin uyarılmasıyla yangı öncüsü (IL-1 β , TNF- α gibi) ve anti apoptotik hedef genlerin transkripsiyonu tetiklenir (Barnes ve Karin, 1997). Çeşitli pro-inflamatuar ve sitotoksik sitokin genleri NF- κ B tarafından aktive edilmiştir. Bu nedenle, oksidatif stresin karaciğer hasarına neden olabileceği olası mekanizmalardan biri NF- κ B aktivasyonudur (May ve Ghosh, 1997). Fipronilin metabolizması sonucu üretilen ROS'ların indüklediği doku hasarına bağlı olarak NF- κ B aktivasyonu artmaktadır. Fipronilin bu parametreler üzerine yaptığı değişiklikler ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Elgawish ve ark., 2018; Sakr ve ark., 2022; Seif ve ark., 2021). Elgawish ve ark. (2019), fipronilin sıçanların karaciğeri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında fipronili 9,7 mg/kg 6 hafta boyunca ağızdan uygulamışlar ve NF- κ B'nin ekspresyonlarında önemli bir artış ($p<0,0001$)

görüldüğünü ve NF- κ B'nin uyarılması yoluyla karaciğer hasarı oluştuğunu bildirmişlerdir. Seif ve ark. (2021), sıçanlara periton içi olarak 10 mg/kg/c.a dozda fipronil uyguladıkları çalışmada, NF- κ B düzeyinin önemli ölçüde yükseldiğini belirtmişlerdir. Sakr ve ark. (2022), fipronili 4,8 mg/kg/c.a dozunda ağızdan 90 gün boyunca sıçanlara uyguladıkları çalışmalarında NF- κ B immün ekspresyonunda önemli bir artış ($p \leq 0,001$) olduğunu vurgulamışlardır. Bu araştırmada diğer çalışmalara benzer şekilde fipronil verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre NF- κ B düzeylerinde önemli bir artış ($p < 0,05$) tespit edilmiştir (Dai ve ark. 2017; Paixao ve ark., 2012). Malvidin ve glikozitleri, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan NF- κ B yolu üzerinde inhibe edici etkiler göstermiştir. Malvidinin *in vivo* olarak NF- κ B düzeyleri ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır ve daha önce yapılan *in vitro* araştırmalarla bu araştırmanın bulguları paralellik göstermektedir (Dai ve ark. 2017; Paixao ve ark., 2012). Dai ve ark. (2017), sıçanlarda monosodyum iyodoasetat ile indüklenen osteoartrit üzerine malvidinin ağrı giderici ve antiinflamatuvar etkilerini araştırdıkları çalışmalarında malvidinin *in vitro* olarak p65'in çekirdeğe taşınmasını baskılayarak I κ B α 'dan bağımsız bir şekilde NF- κ B yolunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Paixao ve ark. (2012), peroksinitritin neden olduğu sıgır arteriyel endotel hücrelerindeki apoptotik etkilere karşı malvidin-3-glikozidinin (25 μ M) etkilerini araştırdıkları çalışmalarında malvidin-3-glikozidinin NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla iNOS ekspresyonu/NO biyosentezi, COX-2 ekspresyonu ve IL-6 üretimi gibi pro-inflamatuvar aracılara baskıladığını bildirmişlerdir.

Sitokinler proinflamatuvar (TNF- α , IL-1 β), antiinflamatuvar (IL-10) ve profibrotik sitokinler (IL-13, dönüştürücü büyüme faktörü- β) olarak ayrılır. Özellikle monositler ve makrofajlar tarafından üretilen TNF- α , çeşitli otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli rol oynayan bir tür proinflamatuvar sitokin olarak bilinir. Protein yapıdaki bu molekül, 212 aminoasidin bir araya gelmesiyle oluşan bir glikoproteindir (Carvalho-Tavares ve ark., 2000). Tümör nekroz faktör α 'nın aşırı ekspresyonu, fagositik hücreler (nötrofiller ve makrofajlar) tarafından artan ROS üretimi yoluyla redoks durumunda dengesizliğe yol açabilir (Glosli ve ark., 2002). Ayrıca TNF- α artışına bağlı olarak, vasküler adezyon molekülü (VCAM-1) ve hücre

içi adezyon molekülü (ICAM-1) gibi moleküllerin ekspresyonu artmakta bu da aktive nötrofillerin infiltrasyonunun artmasına ve karaciğer dokusuna daha fazla zarar verilmesine yol açmaktadır (Atsuta ve ark., 1997). Makrofajların, *in vivo* olarak otoantikor veya antijene spesifik T hücresinden türetilen lenfokinler tarafından aktive edildikten sonra TNF- α , IL-1 ve iNOS aracılı NO oluşumunun ana kaynağını temsil etmeleri nedeniyle, inflamatuvar yanıtın inhibisyonu için ana hedeflerdir. Bu çalışmada fipronil TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde önemli artışa ($p<0,05$) yol açtığı belirlenmiştir. Fipronil ROS üretimi yoluyla TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonuna neden olduğu düşünülmektedir ve daha önce yapılan çalışmalarda bunu desteklemektedir (Awad ve ark., 2021; Bal ve ark., 2022; Elgawish ve ark., 2019; Farrah ve ark., 2018; Seif ve ark., 2021; Selim ve Elsayed, 2023). Bal ve ark. (2022), 7 gün boyunca farelerde 25 mg/kg fipronil uygulamasının, inflamatuvar sitokinlerde (TNF- α , IL-1 β , IL-10) önemli artışa neden olduğunu saptamışlardır. Awad ve ark. (2021), ise 45 gün boyunca ağızdan 10 mg/kg dozda fipronil uyguladıkları sıçanlarda TNF- α 'nın regülasyonunun önemli ölçüde arttığını bildirmişler. Seif ve ark. (2021), sıçanlara fipronil (10 mg/kg/c.a periton içi) uyguladıkları çalışmada fipronil ile indüklenen gruplarda TNF- α , IL-6 ve IL-1 β mRNA/protein seviyelerinde önemli bir ($p<0,05$) artış olduğunu belirtmişlerdir. Elgawish ve ark. (2019), sıçanlara fipronil (9,7 mg/kg 6 hafta boyunca ağızdan) uyguladıkları çalışmada fipronil uygulanan gruplardaki karaciğer homojenatlarında TNF- α ve IL-6 seviyelerinin ($p<0,0001$) diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır. Farrah ve ark. (2018), 15 gün boyunca 15 mg/kg/c.a. dozunda ağızdan fipronil uyguladıkları çalışmalarında TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde önemli artışlar ($p>0,05$) olduğunu vurgulamışlardır. Selim ve Elsayed (2023), çalışmalarında ise 30 gün boyunca 9,7 mg/kg/c.a. dozunda ağızdan fipronil uygulamışlar ve oral mukozal doku örneklerinde TNF- α ve IL-1 β seviyelerinde önemli artışlar ($p\leq 0,05$) bildirmişlerdir. Malvidinin TNF- α ve IL-1 β ekspresyonları üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Dai ve ark., 2017; Decendit ve ark., 2013; Fagundes ve ark., 2021; Fan ve ark., 2022; Sakthivel ve ark., 2020; Shi ve ark., 2023). Bu çalışmada da daha önce yapılan araştırmalara paralel olarak malvidin uygulamasının fipronilin artırmış olduğu TNF- α ve IL-1 β seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Dai ve ark. (2017), sıçanlarda monosodyum iyodoasetat ile indüklenen

osteoartrit üzerine malvidinin ağrı giderici ve antiinflamatuvar etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar malvidinin, kıkırdak dokularında monosodyum iyodoasetat tarafından indüklenen IL-1 β , IL-6, TNF- α 'nın artan ekspresyonlarını düşürdüğünü ($p<0,05$) belirtmişlerdir. Decendit ve ark. (2013), saflaştırılmış üzümünden elde edilen bileşik olan malvidin-3-O- β glukozitinini insan periferik kan mononükleer hücrelerinin hayatta kalma, proliferasyon ve makrofajların aktivasyonunu inhibe etme yeteneklerini araştırdıkları çalışmalarında malvidin-3-O- β glukozitinini aktif makrofajlardan TNF- α ve IL-1 β salıverilmesini azalttığını ($p<0,0042$) bildirmişlerdir. Fagundes ve ark. (2021), peptik ülser tedavisi için malvidinin koruyucu ve iyileştirici potansiyelini farelerde araştırdıkları çalışmalarında non-streoidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ'ler) indüklediği ülser modelinde malvidin (5 mg/kg oral) uygulamasının gastrik ülser oluşumunu önlediğini, TNF- α ve IL-6'nın ekspresyonlarını azalttığını ($p<0,05$) fakat IL-1 β ekspresyonunu etkilemediğini vurgulamışlardır. Fan ve ark., (2022), farelerde LPS ile indükledikleri karaciğer hasarında farklı dozlarda (5, 10 20 mg/kg/c.a) malvidin uygulamasının karaciğerdeki pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β) mRNA seviyelerini önemli ölçüde ($p<0,001$) azalttığını belirtmişlerdir. Sakthivel ve ark. (2020), malvidinin antikanser aktivitesini inceledikleri çalışmalarında Dalton lenfoma asidi (DLA) (1.5×10^6 hücre/hayvan) kaynaklı katı ve asit tümörlü fare modelinde tümörün indüklendiği günden itibaren ardışık 10 gün boyunca malvidin (5 mg/kg canlı ağırlık ve 10 mg/kg canlı ağırlık) uygulamışlardır. Malvidinin kanserin önlenmesi için moleküler hedefler olarak hizmet eden TNF- α ve IL-6 gibi sitokin seviyelerini azalttığını ($p<0,05$) vurgulamışlardır. Shi ve ark. (2023), farelere 5 gün boyunca olarak malvidin (20 mg/kg/c.a. periton içi) uyguladıkları çalışmalarında malvidin ön uygulamasının dalak dokusunda IL-1 β ve TNF- α 'nın mRNA ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığını tespit etmişlerdir.

Nitrik oksit sentetaz enzimi kinetik özelliklerine göre yapısal ve indüklenebilir olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Palmer ve ark., 1987). Bu enzim özellikle makrofajlar ve damar endotel hücrelerinde sentezlenmektedir (Korhonen ve ark., 2005). Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde fipronil

iNOS etkinliğinde önemli artışa ($p<0,05$) yol açtığı belirlenmiştir (Awad ve ark., 2021; Selim ve Elsayed, 2023). Selim ve Elsayed (2023), çalışmalarında ise 30 gün boyunca 9,7 mg/kg/c.a dozunda ağızdan fipronil uygulamışlar ve oral mukozal doku örneklerinde iNOS etkinliğinde önemli artış ($p\leq 0,05$) bildirmişlerdir. Awad ve ark. (2021), ise 45 gün boyunca ağızdan 10 mg/kg dozda fipronil uyguladıkları sıçanlarda beyin nöronal dokularında iNOS'a karşı önemli ölçüde artan immünoreaktivite tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da daha önce yapılan araştırmalara paralel olarak malvidin uygulamasının fipronilin artırmış olduğu iNOS'u önemli düzeyde ($p<0,05$) tespit edilmiştir (Sakthivel ve ark., 2020; Shi ve ark., 2023). Sakthivel ve ark. (2020), malvidinin antikanser aktivitesini inceledikleri çalışmalarında immünohistokimyasal olarak iNOS ekspresyonunu azalttığını ($p<0,05$) vurgulamışlardır. Shi ve ark. (2023) da farelere 5 gün boyunca olarak malvidin (20 mg/kg/c.a. periton içi) uyguladıkları çalışmalarında malvidin ön uygulamasının dalak dokusunda iNOS mRNA ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde ($p<0,001$) azaldığını tespit etmişlerdir.

Siklooksijenaz, araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezlenmesinde anahtar rol oynayan bir enzimdir. Bu enzimin COX-1 ve COX-2 olarak bilinen, iki formu bulunmaktadır. Bu enzimin her iki izoformu da araşidonik asiti prostaglandinlere dönüştürse de bunların vücuttaki dağılımları ve sağlık ya da hastalık durumundaki rolleri arasında önemli farklılıklar vardır. Bu önemli farklılıkların temelinde COX-1 ve COX-2 genlerinin düzenlenmesindeki değişiklikler yatmaktadır. Enzimin yapısal formu olan COX-1 vücutta eksprese edilir ve normal mide mukozasını korumak, böbrek kan akışını etkilemek ve trombosit agregasyonunu teşvik ederek kanın pıhtılaşmasına yardımcı olmak gibi belirli homeostatik işlevleri sağlamaktadır. Buna karşılık, indüklenebilir form olan COX-2, inflamatuvar ve diğer fizyolojik uyaranlara ve büyüme faktörlerine yanıt olarak eksprese edilir, ağrıya aracılık eden ve inflamatuvar süreci destekleyen prostaglandinlerin üretiminde rol oynar (Simon, 1999). Anında yanıt veren bir protein olan COX-2, çevresel toksik maddeler ve proinflamatuvar sitokinler dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak üretilir (Narita ve ark., 2008). Üstelik COX-2'nin sadece inflamasyonda değil aynı zamanda hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını, apoptozu, anjiyogenezi ve metastazı etkileyen karsinogeneizde de rol

oyunadığı düşünölmektedir (Williams ve ark., 1999). Oksidatif stres, ksenobiyotikler ve inflamatuvar uyarınlarla ilişkili hücreseİ hasarın ana nedenidir. Ayrıca ROS, inflamatuvar yanıtı indökler ve COX-2 ekspresyonuna aracılık eder (Barbieri ve ark., 2003). Fipronilin metabolizması sonucu üretilen ROS'ların indökledeğı doku hasarına bağılı olarak COX-2 ekspresyonu artmaktadır. Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmalara benzer şekilde fipronilin COX-2 enzim etkinliğini önemli düzeyde ($p<0,05$) artırdığı tespit edilmiştir (Abd Eldaim ve ark., 2020; Wasef ve ark., 2021). Abd Eldaim ve ark. (2020), sıçanlara 4,85 mg/kg dozunda oral olarak 6 hafta boyunca fipronil uygulamasının hepatik ve renal dokularda COX-2'nin protein ekspresyonlarını önemli ölçüde arttırdığını vurgulamışlardır. Wasef ve ark. (2021), sıçanlarda fipronil (5 mg/kg ağızdan 28 gün boyunca) ile indökleedikleri hepatotoksisite ve lipogenezi araştırdıkları çalışmalarında fipronil uygulamasının hepatik sinüzoidlerin endotelial hücrelerinde COX-2 reaksiyonlarının arttığını ($p\leq 0,05$) bildirmişlerdir. Bu çalışmada daha önce Fagundes ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde COX-2 seviyelerinde malvidin uygulamasının önemli bir düşüş ($p<0,05$) sağlandığı görölmüştür. Fagundes ve ark. (2021) yaptıkları araştırmalarında, çeşitli ajanlarla indöklenen mide ülseri modellerinde malvidinin ülserin iyileşmesini hızlandırdığı ve COX-2'nin gen ekspresyonlarını düşürdüğü belirtilmiştir. Malvidinin güçlü antiinflamatuvar yapısı nedeniyle COX-2 seviyelerinde düşüşe yol açabileceğı düşünölmektedir.

Fipronil gibi çeşitli ksenobiyotiklerin yol açtığı organ hasarlarına, biyokimyasal belirteçlerin düzeyleri tespit edilerek tanı konulmaktadır. Karaciğer hasarında serum ALT ve AST enzim etkinliklerinde artışlar (Pondugula ve ark., 2021); böbrek hasarında ise kreatinin ve üre düzeylerinde artışlar meydana gelir (Wang ve ark., 2021). Serumda ALT ve AST enzim etkinlikleri, üre ve kreatinin fiprolinin metabolizması sonucu üretilen ROS'ların indökledeğı doku hasarına bağılı artan parametrelerdir. Fipronilin bu parametreler üzerine yaptığı değışiklikler ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Abd Eldaim ve ark., 2020; Abou-Zeid ve ark., 2021; Badgujar ve ark., 2015; Badgujar ve ark., 2016; Bal ve ark., 2022; El-Ballal ve ark., 2019; Khalaf ve ark., 2020). El-Ballal ve ark. (2019), sıçanlara 9,7 mg/kg c.a (haftada 3 defa 8 hafta boyunca, oral), Khalaf ve ark. (2020), sıçanlara 10,5 mg/kg c.a (30 gün

boyunca, oral), Bal ve ark. (2022) farelere 25 mg/kg c.a (7 gün boyunca, oral), Badgujar ve ark. (2016) farelere 28 gün boyunca farklı dozlarda fipronile oral olarak sırasıyla 2,5, 5 ve 10 mg/kg c.a., Abou-Zeid ve ark. (2021), sıçanlara 9,7 mg/kg c.a. (28 gün boyunca, oral), Seif ve ark., (2021) sıçanlara periton içi olarak 10 mg/kg/c.a., Abd Eldaim ve ark. (2020), sıçanlara 4,85 mg/kg c.a. (6 hafta boyunca, oral) dozda fipronil uygulamışlar, serum ALT ve AST enzimlerinin etkinliğinde önemli artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da diğer çalışmalara (Abd Eldaim ve ark., 2020; Abou-Zeid ve ark., 2021; Badgujar ve ark., 2015; Badgujar ve ark., 2016; Bal ve ark., 2022; El-Ballal ve ark., 2019; Khalaf ve ark., 2020) benzer şekilde fipronil uygulanan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum ALT ve AST değerlerinde önemli düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada fipronil uygulanan grupta kontrol grubuna göre kreatinin, BUN değerlerinde El-Ballal ve ark. (2019), Badgujar ve ark. (2015), Khalaf ve ark. (2020), Abd Eldaim ve ark. (2020), Abou-Zeid ve ark. (2021) ve Sakr ve ark. (2022)'nın yaptıkları çalışmaya benzer şekilde önemli düzeyde bir artış olduğu tespit edilmiştir. Sakthivel ve ark. (2020), malvidinin antikanser aktivitesini inceledikleri çalışmalarında Dalton lenfoma asidi (DLA) (1.5×10^6 hücre/hayvan) kaynaklı katı ve asit tümörlü fare modelinde tümörün indüklendiği günden itibaren ardışık 10 gün boyunca malvidin (5 mg/kg c.a. ve 10 mg/kg c.a.) uyguladıkları çalışmada tümör ilerlemesinin etkilediği AST ve ALT karaciğer enzimlerinin seviyelerinde önemli bir düşüş ($p < 0,01$) tespit etmişlerdir. Zou ve ark. (2021), ise sıçanlarda tip 2 diyabet modeli oluşturdıkları çalışmalarında 12 hafta boyunca günlük 100 mg/kg c.a. oral malvidin uygulamasının serum ALT ve AST seviyelerinde önemli bir düşüşe ($p < 0,001$) neden olduğunu vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada ise farelerde LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarında malvidin artan dozlarda uygulamasının (5, 10 ve 20 mg/kg c.a.) ALT ve AST seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ($p < 0,01$) ve malvidinin karaciğer fonksiyonunu modüle etmede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Fan ve ark., 2022). Emadi ve ark. (2020), renal iskemik reperfüzyon modeli oluşturdıkları sıçanlara 21 gün süreyle malvidin (100 mg/kg c.a., oral) uygulamışlar ve malvidin uygulamasının plazma BUN ile kreatinin fraksiyonel atılımında düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da diğer araştırmacıların bulgularına paralel olarak malvidin uygulamasının fipronilin artırdığı

değerleri (AST, ALT, kreatinin ve BUN) normal düzeylere getirdiği tespit edilmiştir (Emadi ve ark., 2020; Fan ve ark., 2022; Sakthivel ve ark., 2020; Zou ve ark., 2021).

Histopatolojik incelemeler sonucunda tek başına fipronil uygulanan grupta, karaciğerde şiddetli hiperemi, yer yer kanama odakları, hafif şiddette ve çoğunluğunu lenfositlerin oluşturduğu yangısal hücre infiltrasyonları, Kupffer hücrelerinde proliferasyon, hepatositlerde yağlanma (steatozis) ve dejenerasyonların bulunduğu dikkati çekmiştir. Böbrek dokusunda da şiddetli hiperemi, yer yer değişik şiddette kanamalar, tubul epitellerinde dökülmeler ve değişik şiddette yangısal hücre infiltrasyonları saptanmıştır. Beyin, beyincik ve hipokampusların histopatolojik incelemesinde ise damarlarda şiddetli hiperemi, belirgin ödem, yer yer değişik şiddetlerde kanamalar ile nöronlarda dejeneratif değişiklikler ve bazı alanlarda nekrotik hücreler dikkati çekmiştir. Fipronille yapılan başka *in vivo* çalışmalarda, bizim bulgularımıza benzer histopatolojik bulgular tespit edilmiştir (Abdel- Daim ve ark., 2018; Abd Eldaim ve ark., 2020; Abou-Zeid ve ark., 2021; Awad ve ark., 2021; Badgujar ve ark., 2015; Badgujar ve ark., 2016; Bakr ve ark., 2022; Bal ve ark., 2022; El-Ballal ve ark., 2019; Elshony ve ark., 2021; Khalaf ve ark., 2020; Sayed ve ark., 2019). El-Ballal ve ark. (2019), sıçanlara 9,7 mg/kg dozda oral olarak haftada 3 defa olacak şekilde 8 hafta boyunca fipronil uyguladıkları çalışmada, fipronil uygulamasının merkezi damar çevresinde hepatositlerin hidropik dejenerasyonunu indüklediğini bildirmişlerdir. Khalaf ve ark. (2020), sıçanlarda fipronil (10,5 mg/kg) ile indükledikleri böbrek ve karaciğer hasarını değerlendirmiş, dilate santral veni çevreleyen hepatositlerde yağlanma ve vakuoler dejenerasyon, safra kanalında konjesyon, dilatasyon ile birlikte ödem ve kortikal tübüllerin astar epiteline vakuolar dejenerasyon tespit etmişlerdir. Elshony ve ark. (2021), sıçanlarda 28 gün boyunca fipronil (5 mg/kg, oral) uygulayarak oluşturdukları nöronal disfonksiyonda fipronil grubunda şiddetli vasküler konjesyon, perivasküler lenfositik hücre infiltrasyonları, nöronal nekroz ve satellitoz görüldüğünü belirtmişlerdir. Sayed ve ark. (2019), fipronil (13,277 mg/kg, oral) ile sıçanlarda subakut toksisite oluşturdukları çalışmada portal ven boyunca konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve daha az miktarda fibrozis tespit etmişlerdir. Bal ve ark. (2022), 7 gün boyunca farelerde 25 mg/kg fipronil uygulamasının karaciğer dokusunda mikrosteatoz, hepatosit hipertrofisi, nekroz, dejenerasyon ve dilate sinüzoidler

görüldüğünü bildirmişlerdir. Bakr ve ark. (2022), sıçanlarda fipronil (13,277 mg/kg, oral, 28 gün boyunca) ile indükledikleri beyin hasarında fipronil grubunda hipokampustaki subikulum nöronlarında hücre içi vakuolizasyon ve serebellum kan damarlarında konjesyon belirlemişlerdir. Badgujar ve ark. (2015), fareleri 28 gün boyunca farklı dozlarda fipronile oral olarak sırasıyla 2,5, 5 ve 10 mg/kg dozda maruz bıraktıkları çalışmada 2,5 mg/kg doz uygulamasında böbrekte dejenere alanlar, 5 mg/kg dozda kortiko-medüller bölgede şiddetli koagülatif nekroz ve 10 mg/kg dozda tubuler epitel hücrelerinin nekrozu ile birlikte şiddetli dejenerasyon tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada yüksek doz fipronil (10 mg/kg) uygulanan farelerin serebral korteksinde piramidal hücre tabakasının dejenerasyonu ve ayrılmasıyla birlikte moleküler tabakada şiddetli vakuolasyon ile beyinciğinde granüler tabakada küçük eozinofilik kırmızı hücrelerle karakterize nöron nekrozu, gri maddede vakuolasyon ve Nissl maddesinin kaybıyla Purkinje hücre tabakasında dejenerasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Badgujar ve ark. (2016), aynı metodla oluşturdukları çalışmada karaciğer dokusunda; fipronilin 2,5 mg/kg dozda uygulandığı grupta karaciğerde konjestif alanlar ve hepatositlerde hafif nekroz, 5 mg/kg dozda uygulandığı grupta vakuoler değişikliklerle birlikte merkezi damar çevresinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler, 10 mg/kg dozda uygulandığı grupta ise hepatositlerin nekrozuna yol açan ciddi dejeneratif değişiklikler tespit etmişlerdir. Awad ve ark. (2021) ise 45 gün boyunca ağızdan 10 mg/kg dozda fipronil uyguladıkları sıçanların beyin dokularında; hipokampüste piramidal tabakada düzensizlik, hücre kaybı alanları ve dejenerasyonun farklı aşamalarında nöronlar ve buna ek olarak polimorfik yoğun glia hücresi infiltrasyonu ile vakuolar boşluklar, serebellumda Purkinje hücre kaybı alanları, kaudat putamende perivasküler infiltrasyonlarla birlikte vasküler konjesyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Abou-Zeid ve ark. (2021), sıçanlara 28 gün boyunca fipronil (9,7 mg/kg, oral) uyguladıkları çalışmada karaciğer santral vende inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile konjesyon, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ile birlikte inflamatuvar hücrelerin infiltre ettiği koagülatif nekroz alanları ve böbrekte Bowman boşluğunun artmasıyla glomerüllerde küçülme, glomerüllerde ve interstisyel dokuda konjesyon, glomerüler hücrelerde ve böbrek tubul epitelinde piknotik çekirdekli nekroz, böbrek tubul epitelinde lümenlerinin tıkanmasıyla şişme, periglomerüler ödem ve interstisyel

dokuda inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit etmişlerdir. Abd Eldaim ve ark. (2020), sıçanlara 4,85 mg/kg dozunda oral olarak 6 hafta boyunca fipronil uyguladıkları çalışmada hepatik dokuda fokal sinüzoidal konjesyonla ilişkili hepatositlerin belirgin balonlaşması ile renal dokuda mononükleer infiltratlar tarafından yoğun bir şekilde infiltre edilen renal tubuler epitel hücrelerinin fokal nekrozu görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmada malvidin uygulamasının karaciğer, böbrek ve beyinde fipronilin neden olduğu patolojik bulgulara belirgin şekilde iyileşme sağladığı görülmüştür. Bu bulgular malvidin ile ilgili daha önce karaciğer üzerinde yapılan diğer araştırmalarla (Fan ve ark., 2022; Sakthivel ve ark., 2020; Zou ve ark., 2021) paralellik göstermektedir. Fan ve ark., (2022), farelerde LPS ile indüklenen akut karaciğer hasarında histopatolojik olarak LPS grubunda belirsiz nükleoplazmalı kötü tanımlanmış hepatositler ve artmış inflamatuvar hücreleri üzerinde malvidin uygulamasının olumlu etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Sakthivel ve ark. (2020), malvidinin antikanser aktivitesini inceledikleri çalışmada farelerde hepatotoksisteye neden olan tümör modelinin oluşturduğu hasara karşı malvidin uygulanan (5 ve 10 mg/kg c.a.) farelerde hafif değişmiş lobüler polimorfik veziküler çekirdekler, multiloküle dev hücreler, fokal sentrilobüler nekroz, tıkanmış ve dilate olmuş santral ven tespit etmişlerdir. Zou ve ark., (2021), sıçanlarda tip 2 diyabet modeli oluşturdukları çalışmalarında malvidin (100 mg/kg c.a., oral) uygulamasının karaciğer patolojik değişikliklerini hafiflettiğini ve hepatik nötral lipitleri azalttığını bildirmişlerdir. Malvidin uygulamasının kalp ve dalak üzerinde neden olduğu değişikliklerin incelendiği diğer çalışmalarda ise olumlu sonuçlarla karşılaşılmıştır (Shi ve ark., 2023; Wei ve ark., 2017). Shi ve ark. (2023), farelere 5 gün boyunca intraperitoneal olarak malvidin (20 mg/kg) uyguladıkları çalışmalarında malvidin ön uygulamasının dalak sepsisinde LPS ile indüklenen histopatolojik hasarı hafiflettiğini tespit etmişlerdir. Wei ve ark. (2017) ise malvidinin (100 ve 200 mg/kg, oral), izoproterenol ile uyarılan kardiyak nekrozda histopatolojik değişiklikleri ve hasarlı mitokondriyi önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmişler. Yapılan literatür taraması sonucu çalışmamızda alınan diğer dokularla (böbrek ve beyin) ilgili histopatolojik olarak başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Fipronilin ayrıca önemli bir apoptozis indükleyicisi olduğu da düşünülmektedir. Apoptozis, hayvanlarda gelişim ve yetişkinlik dönemlerinde gereksinim duyulan her yaşam aşaması için esastır. Bunun yanında hücreler, hastalıkların veya zararlı ajanların etkileri altında olduğunda veya bağışıklık tepkilerinde koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkabilirler. Apoptozis, organizmanın çeşitli dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak meydana gelir ve yaşam boyunca devam eder. Böylece, hücre ölümü (apoptozis) ve yeniden yapım (mitoz), bu dokularda doku homeostazını sürdürmek için dinamik bir denge oluşturur (Richardson ve Kumar, 2002). Apoptozis, genellikle iki ana yol olarak bilinen dışsal (ölüm reseptörüne bağımlı) ve içsel (mitokondriye bağımlı) yollar aracılığıyla tetiklenebilir (Martin ve Baehrecke, 2004). İçsel yol, endojen ve ekzojen faktörlere yanıt olarak mitokondri dış zarının geçirgen hale gelmesi ile başlar, ardından sitokrom C'nin salınması ve kaspazların aktivasyonu gerçekleşir ve bu da hücre ölümüne yol açar (Guidolin ve ark., 2014). Fipronile maruz kalma, insanlarda ve hayvanlarda, ROS üretimi yoluyla apoptozisle sonuçlanan nöronal hücre hasarı oluşturmak da dahil olmak üzere olumsuz sağlık sonuçlarıyla bağlantılıdır. Fipronilin neden olduğu bu olumsuz sonuçlar *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Abou-Zeid ve ark., 2021; Abd Eldaim ve ark., 2020; Awad ve ark., 2021; Bakr ve ark., 2022; Elshony ve ark., 2021; Khalaf ve ark., 2020; Sayed ve ark., 2019). Abou-Zeid ve ark. (2021), sıçanlara 28 gün boyunca fipronil (9,7 mg/kg, oral) uyguladıkları çalışmada karaciğer, beyin ve böbrekte kaspaz-3 gen ekspresyonunda önemli bir artış ($p \leq 0,05$) bildirmişlerdir. Abd Eldaim ve ark. (2020), sıçanlara 4,85 mg/kg dozunda oral olarak 6 hafta boyunca fipronil uygulamasının hepatik ve renal dokularda kaspaz-3 immün reaktivitesinde önemli bir artış kaydedildiğini (pozitif hücrelerin yüzdeleri $3,40 \pm 0,40$ ve $2,60 \pm 0,50$) vurgulamışlardır. Awad ve ark. (2021) ise 45 gün boyunca ağızdan 10 mg/kg dozda fipronil uyguladıkları sıçanlarda beyin nöronal dokularında kaspaz-3'e karşı önemli ölçüde ($p \leq 0,05$) artan immünoreaktivite tespit etmişlerdir. Bakr ve ark. (2022), sıçanlarda fipronil (13,277 mg/kg, oral, 28 gün) ile indükledikleri beyin hasarında kaspaz-3 mRNA gen ekspresyonunun önemli ölçüde ($p < 0,0001$) arttığını belirtmişlerdir. Elshony ve ark. (2021), sıçanlarda 28 gün boyunca fipronil (5 mg/kg, oral) ile nöronal hasarı oluşturdukları çalışmada nörona özgü kaspaz-3 ekspresyonunda artış ($p \leq 0,05$)

olduğunu bildirmişlerdir. Khalaf ve ark. (2020), sıçanlarda fipronil (10,5 mg/kg) ile indükledikleri böbrek ve karaciğer hasarında kaspaz-3 geninin karaciğer ve böbrek dokularında kontrole kıyasla 4 kattan fazla eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Sayed ve ark. (2019), fipronil (13,277 mg/kg, oral) ile sıçanlarda subakut toksisite oluşturdıkları çalışmada fipronilin karaciğerde kaspaz-3 gen ekspresyonunda önemli bir artış ($p<0,05$) olduğunu bildirmişlerdir.

Fipronilin pro-apoptik ve anti-apoptik gen ekspresyonlarında neden olduğu olumsuz sonuçlar *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Abou-Zeid ve ark., 2021; Bakr ve ark., 2022; Elshony ve ark., 2021; Sayed ve ark., 2019). Abou-Zeid ve ark. (2021), sıçanlara 28 gün boyunca fipronil (9,7 mg/kg, oral) uyguladıkları çalışmada karaciğer, beyin ve böbrekte Bcl-2 gen ekspresyonunun ($p\leq 0,05$) azaldığını bildirmişlerdir. Bakr ve ark. (2022), sıçanlarda fipronil (13,277 mg/kg, oral, 28 gün) ile indükledikleri beyin hasarında beyin pro-apoptotik (Bax) mRNA gen ekspresyonunun önemli ölçüde ($p<0,0001$) arttığını ancak anti-apoptotik (Bcl-2) mRNA genlerinin ise ekspresyonunun azaldığını ($p<0,0001$) belirtmişlerdir. Elshony ve ark. (2021), sıçanlarda 28 gün boyunca fipronil (5 mg/kg, oral) ile nöronal hasarı oluşturdıkları çalışmada nörona özgü Bcl-2 ekspresyonunda düşüş ($p\leq 0,05$) olduğunu bildirmişlerdir. Sayed ve ark. (2019), fipronil (13,277 mg/kg, oral) ile sıçanlarda subakut toksisite oluşturdıkları çalışmada fipronilin karaciğerde pro-apoptotik (Bax) gen ekspresyonunda önemli bir artış ($p<0,05$) ve anti-apoptotik (Bcl-2) mRNA gen ekspresyonunda ise önemli bir düşüşe ($p<0,05$) neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada fipronilin apoptozis yoluyla neden olduğu olumsuz sonuçlarda malvidin uygulaması ile iyileşme sağlandığı ve bu iyileşmenin *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur (Fagundes ve ark. 2021; Fan ve ark., 2022; Wang ve ark. 2018). Fagundes ve ark. (2021), peptik ülser tedavisi için malvidinin koruyucu ve iyileştirici potansiyelini farelerde etanol, NSAİİ'ler, iskemik reperfüzyon, asetik asit ve çoklu ilaç kullanımıyla uyarılan duodenal ülser ile indüklenen mide ülseri modellerinde araştırmışlardır. Malvidin aktivitesinin mekanizmasını araştırmak için oksidatif ve inflamatuvar genlerin ekspresyon seviyelerini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar malvidinin (5 mg/kg oral) etanol, non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar ile gastrik ülser oluşumunu önlediğini ve

6 günlük iskemik reperfüzyondan sonra dokuyu onardığını ve asetik asit kaynaklı ülserin iyileşmesini hızlandırdığını, kaspaz-3 gen ekspresyonlarını azalttığını bildirmişlerdir. Fan ve ark. (2022), farelerde LPS ile oluşturdukları akut karaciğer hasarında karaciğer dokusundan aldıkları örneklerde LPS grubunda belirgin şekilde artan kaspaz 3, kaspaz 9 ve sitokrom C'nin salınımının malvidin uygulaması ile engellenerek bu uygulamanın faydalı etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Wang ve ark. (2018), HepG2 hücreleri enjekte edilen farelerde gelişen tümörlerin immünohistokimyal analizi sonucunda, farelere 4 hafta boyunca 40 ve 80 mg/kg dozunda gavaj ile malvidin-3-galaktozid (M3G) uygulamasının bölünmüş kaspaz-3 ekspresyonunu belirgin şekilde ($p<0,05$) artırdığını M3G'nin tümör hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde baskılayabildiğini ve apoptozisi tetikleyebildiğini bildirmişlerdir.

Malvidinin yangı ve apoptozisi önleyici etkileri güçlü antioksidan etkisine atfedilmektedir. Malvidin yapısında A halkasında 2, B halkasında 1 ve C halkasında 1 hidroksil grubu ile C halkasında 2 metoksi grubu bulunmaktadır. Yapısında bulunan hidroksil ve metil grupları serbest radikalleri temizlemede oldukça etkilidir. Ayrıca glikosile edilmiş B halkası da antioksidan etkinlik için oldukça önemlidir (Wang ve ark., 1997).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Fipronil, tarım ve veterinerlik faaliyetlerinde yaygın olarak kullanılan insektisidler arasında yer almaktadır (Tingle ve ark., 2003). İnsan ve hayvanlardaki toksisite, önerilen dozun aşılması veya uygun olmayan kullanım nedeniyle meydana gelmektedir (Anadon ve Gupta, 2012). Ayrıca fipronil tarımda kullanıldığında biyobirikim etkisine sahiptir; dolayısıyla besin zinciri yoluyla hayvanları ve insanları etkilemektedir (Qin ve ark. 2015). Fipronil hakkındaki halk sağlığı endişeleri, sıçanlarda tiroid kanserini belgeleyen raporlar sonrasında artmıştır (Hurley ve ark., 1998). Böcekler seçici toksisitesine rağmen fipronilin başlıca metabolitleri olan fipronil sülfon ve fipronil disülfonun memeli GABA-kapılı klorür kanallarında böcekler göre daha yüksek etkinliğe sahiptir. Bu durum, bu metabolitlerin, ana bileşiğe göre böcekler ve hedef olmayan organizmalar için potansiyel bir tehlike oluşturabileceğini göstermektedir (Das ve ark., 2006).

Son yıllarda, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere çoğu ülkede çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak yerel doğal ürünlerin kullanılma oranlarında önemli artışlar görülmüştür (Antika ve Dewi, 2020; Fang, 2014). Özellikle doğal ürünlerdeki çeşitli biyoaktif bileşiklerin canlılar üzerinde çok yönlü etkileri vardır. Bu biyoaktif bileşiklerin en önemlileri arasında polifenolik yapıda bulunan maddeler yer alır. Polifenolik bileşiklerin önemli üyelerinden biri flavonoidlerdir. Antosiyaninler, flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir ve flavilyum katyonları oluşturma kapasiteleri nedeniyle diğer flavonoidlerden ayrılırlar (Harborne, 1998). Antosiyaninlerin önemli bir üyesi olan malvidinin antioksidan, yangı ve kanser önleme ile nöroprotektif etkileri sebebiyle umut verici bir ajan olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle son yıllarda malvidin araştırmacılar tarafından ilgi odağı haline gelmiş antosiyaninlerden biridir. Malvidin kimyasal yapısı dolayısıyla güçlü antioksidan aktivitesinin bulunması ve suda çözünmesi sonucu biyoyararlanımının yüksek olması sebebiyle oksidatif strese ve sonucunda şekillenen bozukluklara karşı koruyucu olarak tercih edilen bir bileşiktir (Decendit ve ark, 2013; Fagundes ve ark., 2021).

Bu araştırma bulgulara bağlı olarak, 5 mg/kg c.a dozunda uygulanan fipronilin ROS'ların indüklediği doku hasarı sonucunda lipid peroksidasyona, antioksidan savunma sisteminin etkinliğinde/düzeyinde azalmaya, prositokinlerin seviyelerinde artmaya, yangısal enzimlerin etkinliğinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca fipronilin histopatolojik değişikliklere ve apoptoza (kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax ekspresyonlarında artışa, Bcl-2 ekspresyonunda ise düşüşe) neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan 5 mg/kg c.a malvidin ön uygulamasının fipronilin yol açtığı biyokimyasal, toksikolojik ve histopatolojik değişiklikleri önlediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, malvidinin fipronil ile indüklenen karaciğer, böbrek ve beyin hasarlarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Daim MM, Shaheen HM, Abushouk AI, Toraih EA, Fawzy MS, Alansari WS, Bungau S (2018).** Thymoquinone and diallyl sulfide protect against fipronil-induced oxidative injury in rats. *Environ. Sci. Pollut.*, **25(24)**, 23909-23916.
- Abdel-Daim MM, Dessouki AA, Abdel-Rahman HG, Eltaysh R, Alkahtani S (2019).** Hepatorenal protective effects of taurine and N-acetylcysteine against fipronil-induced injuries: the antioxidant status and apoptotic markers expression in rats. *Sci. Total Environ.*, **650**, 2063-2073.
- Abd Eldaim MAA, Abd El Latif AS, Hassan A, El-Borai NB (2020).** Ginseng attenuates fipronil-induced hepatorenal toxicity via its antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory activities in rats. *Environ. Sci. Pollut.*, **27(36)**, 45008-45017.
- Abou-Zeid SM, Tahoun EA, AbuBakr HO (2021).** Ameliorative effects of jojoba oil on fipronil-induced hepatorenal-and neuro-toxicity: the antioxidant status and apoptotic markers expression in rats. *Environ. Sci. Pollut.*, **28(20)**, 25959-25971.
- Afrin S, Giampieri F, Gasparri M, Forbes-Hernandez TY, Varela-L'opez A, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2016).** Chemopreventive and therapeutic effects of edible berries: A focus on colon cancer prevention and treatment. *Molecules*, **21(2)**, 169.
- Aiuti A, Bachoud-Levi AC, Blesch A, Brenner MK, Cattaneo F, Chioccia EA (2007).** Progress and prospects: gene therapy clinical trials (part 2). *Gene Ther.*, **14(22)**, 1555-63.
- Ali HM, Almagribi W, Al-Rashidi MN (2016).** Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structureactivity relationship and synthesis. *Food Chem.*, **194**, 1275–1282.
- Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E (2008).** Colorado potato beetle resistance to insecticides. *Am. J. Potato Res.*, **85(6)**, 395-413.
- Anadon AN, Gupta RC (2012).** *Fipronil*. In Gupta RC. (Eds), *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Amsterdam: Academic press/Elsevier, p: 604-608.
- Antika LD, Dewi RM (2020).** Pharmacological aspects of fisetin. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.*, **11**, 1-9.
- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, Schleimer RP (1997).** Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **17 (5)**, 571–582.

Awad MA, Ahmed ZSO, AbuBakr HO, Elbargeesy GAEFH, Moussa MH (2021). Fipronil induced oxidative stress in neural tissue of albino rat with subsequent apoptosis and tissue reactivity, *Acta Histochemica.*, **123(6)**, 151764.

Aydin B (2011). Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rat. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **100**, 165–171.

Badgujar PC, Pawar NN, Chandratre GA, Telang AG, Sharma AK (2015). Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pestic. Biochem. Phys.*, **118**, 10-18.

Badgujar PC, Chandratre GA, Pawar NN, Telang AG, Kurade NP (2016). Fipronil induced oxidative stress involves alterations in SOD 1 and catalase gene expression in male mice liver: Protection by vitamins E and C. *Environ. Toxicol.*, **31(9)**, 1147-1158.

Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochem. (Mosc)*, **69(1)**, 7580.

Bak MJ, Truong VL, Kang HS, Jun M, Jeong WS (2013). Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 409321.

Bakr AA, Ali M, Ibrahim K (2022). Garlic and allopurinol alleviate the apoptotic pathway in rats' brain following exposure to fipronil insecticide. *Environ Anal. Health Toxicol.*, **37(4)**, e2022037-0.

Bal SS, Leishangthem GD, Sethi RS, Singh A (2022). P-coumaric acid ameliorates fipronil induced liver injury in mice through attenuation of structural changes, oxidative stress and inflammation. *Pestic. Biochem. Phys.*, **180**, 104997.

Barbieri SS, Eligini S, Brambilla M, Tremoli E, Colli S (2003). Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.*, **60(1)**, 187-197.

Barnard H, Dooley AN, Areshian G, Gasparyan B, Faull KF (2011). Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands. *J. Archaeol. Sci.*, **38(5)**, 977-984.

Barnes PJ, Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.*, **336(15)**, 1066-1071.

Bastin AR, Sadeghi A, Abolhassani M, Doustimotlagh AH, Mohammadi A (2020). Malvidin prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammation in human peripheral blood mononuclear cells. *IUBMB Life*, **72(7)**, 1504-1514.

Bellezza I, Gambanco I, Minelli A, Donato R (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol. Cell Res.*, **1865**(5), 721-733.

Bencic DC, Villeneuve DL, Biales AD, Blake L, Durhan EJ, Jensen KM, Kahl MD, Makynen EA, Martinovi'c-Weigelt D, Ankley GT (2013). Effects of the insecticide fipronil on reproductive endocrinology in the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.*, **32**, 1828-1834.

Beugnet F, Soll M, Bouhsira E, Franc M (2015). Sustained speed of kill and repellency of a novel combination of fipronil and permethrin against *Ctenocephalides canis* flea infestations in dogs. *Parasit. Vectors*, **8**, 52.

Bhui K, Prasad S, George J, Shukla Y (2009). Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.*, **282**, 167-176.

Boateng J, Verghese M, Shackelford L, Walker LT, Khatiwada J, Ogutu S, Chawan CB (2007). Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats. *Food Chem. Toxicol.*, **45**(5), 725-732.

Bobé A, Coste CM, Cooper JF (1997). Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(12), 4861-4865.

Bonneau S, Reymond N, Gupta S, Navarro C (2015). Efficacy of a fixed combination of permethrin 54.5% and fipronil 6.1% (Effitix) in dogs experimentally infested with *Ixodes ricinus*. *Parasit. Vectors*, **8**, 204.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343-355.

Boussabbeh M, Ben Salem I, Belguesmi F, Bacha H, Abid-Essefi S (2016a). Tissue oxidative stress induced by patulin and protective effect of crocin. *Neurotoxicology*, **53**, 343-349.

Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P (2006). Cell death in the nervous system. *Nature*, **443**(7113), 796-802.

Bresciani L, Angelino D, Vivas E, Kerby R, Garcia-Viguera C, Del Rio D, Rey F, Mena P (2019). Differential catabolism of an anthocyanin-rich elderberry extract by three gut microbiota bacterial species. *J. Agric. Food Chem.*, **68**(7), 1837-1843.

Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P (2000). A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ. Res.*, **87**(12), 1141-1148.

Castro Janer E, Klafke GM, Capurro ML, Schumaker TT (2015). Crossresistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.*, **210**, 77-83.

Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996). Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, **84(6)**, 853-862.

Chtourou Y, Aouey B, Kebieche M, Fetoui H (2015). Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF κ B and p53 signaling pathways. *Chem. Biol. Interact.*, **239**, 76–86.

Clasen B, Loro VL, Cattaneo R, Moraes B, Lopes T, de Avila LA, Zanella R, Reimche GB, Baldisserotto B (2012). Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: implications for ricefish cultivation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **77**, 45–51.

Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J (2000). Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radic. Res.*, **32(5)**, 381-397.

Dai J, Mumper RJ (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15**, 7313-7352.

Dai T, Shi K, Chen G, Shen Y, Pan T (2017). Malvidin attenuates pain and inflammation in rats with osteoarthritis by suppressing NF- κ B signaling pathway. *Inflamm. Res.*, **66(12)**, 1075-1084.

Das PC, Cao Y, Cherrington N, Hodgson E, Rose RL (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **164(3)**, 200-214.

Das A, Choudhury D, Chakrabarty S, Bhattacharya A, Chakrabarti G (2012). Acenaphthenequinone induces cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis via disruption of cellular microtubules. *Toxicol. Research*, **1**, 171–185.

Dasuri K, Zhang L, Keller JN (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **62**, 170-185.

Decendit A, Mamani-Matsuda M, Aumont V, Waffo-Teguo P, Moynet D, Boniface K, Mossalayi MD (2013). Malvidin-3-O- β glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **86(10)**, 1461-1467.

De Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Oliveira RJ, Mathias MI (2012). Cytotoxicity of fipronil on mice liver cells. *Microsc. Res. Tech.*, **75**, 28–35.

Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95.

El-Ballal S Salah, A Amer Hany, A Tahoun Enas, B El-Borai Nermeen, Zahra Aa (2019). Bee pollen alleviates fipronil and emamectin benzoate induced-hepatorenal toxicity in rats. *Assiut Vet. Med. J.*, **65(161)**, 164-173.

Elgawish RA, Abdelrazek HM, Ismail SA, Loutfy NM, Soliman MT (2019). Hepatoprotective activity of *Uncaria tomentosa* extract against sub-chronic exposure to fipronil in male rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **26**, 199-207.

Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, **35**(4), 495-516.

Elshony N, Nassar AM, El-Sayed YS, Samak D, Noreldin A, Wasef L, Shaheen HM (2021). Ameliorative role of cerium oxide nanoparticles against fipronil impact on brain function, oxidative stress, and apoptotic cascades in albino rats. *Front. Neurosci.*, **15**, 651471.

Emadi S, Sadeghi I, Khastar H (2020). Malvadin prevents kidney from renal ischemia-induced oxidative damage in rats. Running title: malvidin and acute renal failure. *Jordan J. Pharm. Sci.*, **13**(3).

Enaru B, Dreţcanu G, Pop TD, Stănilă A, Diaconeasa Z (2021). Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, **10**(12), 1967.

Environmental Protection Agency (1996). New pesticide fact sheet. PB96-181516.

Esposito D, Damsud T, Wilson M, Grace M, Strauch R, Li X, Lila M, Komarnytsky SB (2015). Currant anthocyanins attenuate weight gain and improve - glucose metabolism in diet-induced obese mice with intact, but not disrupted gut microbiome. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 6172.

Fagundes FL, Pereira QC, Zarriqueta ML, Dos Santos RDC (2021). Malvidin protects against and repairs peptic ulcers in mice by alleviating oxidative stress and inflammation. *Nutrients*, **13**(10), 3312.

Fan H, Cui J, Liu F, Zhang W, Yang H, He N, Dong J (2022). Malvidin protects against lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via regulating Nrf2 and NLRP3 pathways and suppressing apoptosis and autophagy. *Eur. J. Pharmacol.*, **933**, 175252.

Fang J (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.*, **46**, 508–520.

Faria A, Pestana D, Azevedo J, Martel F, de Freitas V, Azevedo I, Mateus N, Calhau C (2009). Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells- putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**, 1430-1437.

Farrah K, Farid AS, Mohammed AK (2018). Antioxidant and anti-inflammatory effects of flaxseed oil and fish oil in fipronil induced oxidative stress in rats. *Benha Vet. Med. J.*, **35**(2), 44-56.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int. J. Cancer.*, **136**(5), 359–386.

Fernandes I, Faria A, Calhaub C, de Freitas V, Mateusa N (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *J. Funct. Foods*, **7**, 54.

Ferrer-Gallego R, Soares S, Mateus N, Rivas-Gonzalo J, Escribano-Bailón M, de Freitas V (2015). New Anthocyanin-Human Salivary Protein Complexes. *Langmuir*, **31**, 8392.

Figueira I, Menezes R, Macedo D, Costa I, Dos Santos C (2017). Polyphenols beyond barriers: a glimpse into the brain. *Curr. Neuropharmacol.*, **15**, 562.

Frank T, Netzel M, Strass G, Bitsch R, Bitsch I (2003). Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **81(5)**, 423-435.

Fuchs Y, Steller H (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, **147(4)**, 742-58.

Fung HT, Chan KK, Ching WM, Kam CW (2003). A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **41**, 245–248.

Gaines TB (1969). Acute toxicity of pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **14**, 515–534.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, **19(1)**, 107-20.

Garcia-Diaz DF, Johnson MH, de Mejia EG (2015). Anthocyanins from fermented berry beverages inhibit inflammation-related adiposity response in vitro. *J. Med. Food*, **18(4)**, 489-496.

Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Cianciosi D, Quiles JL, Mezzetti B, Xiao J, Battino M (2021). The efficacy of berries against lipopolysaccharide-induced inflammation: A review. *Trends Food Sci. Technol.*

Gerl R, Vaux DL (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinog.*, **26(2)**, 263-70.

Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.*, **46(8)**, 497-510.

Giampieri F, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Mazzoni L, Capocasa F, Sabbadini S, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Rosati C, Pandolfini T, Molesini B, Sánchez-Sevilla JF, Amaya I, Mezzetti B, Battino M (2018). Overexpression of the anthocyanidin synthase gene in strawberry enhances antioxidant capacity and cytotoxic effects on human hepatic cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, **66(3)**, 581-592.

Gil-Cardoso K, Comitato R, Gin'és I, Ard'evol A, Pinent M, Virgili F, Terra X, Blay M (2019). Protective effect of proanthocyanidins in a rat model of mild intestinal

inflammation and impaired intestinal permeability induced by LPS. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **63**(8), e1800720.

Gill KK, Dumka VK (2013). Antioxidant status in oral subchronic toxicity of fipronil and fluoride co-exposure in buffalo calves. *Toxicol. Ind. Health.*, **32**, 251–259.

Glaser N, Stopper H (2012). PAT: mechanism of genotoxicity. *Food Chem. Toxicol.*, **50**(5), 1796-1801.

Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.*, **72**(11), 1493-1505.

Glosli H, Tronstad KJ, Wergedal H, Müller F, Svardal A, Aukrust P, Berge RK, Prydz H, (2002). Human TNF- α in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes. *FASEB J.*, **16** (11), 1450–1452.

Gong X, Ivanov VN, Hei TK (2015). 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine (TMP) down-regulated arsenic-induced heme oxygenase-1 and ARS2 expression by inhibiting Nrf2, NF-kappaB, AP-1 and MAPK pathways in human proximal tubular cells. *Arch. Toxicol.*, **90**, 2187–2200.

Gornal AC, Bardawill CJ, David MM (1949). Protein-Biuret colorimetric method. *J. Biol. Chem*, **177**(751), 10-1016.

Gorski S, Marra M (2002). Programmed cell death takes flight: genetic and genomic approaches to gene discovery in Drosophila. *Physiol. Genomics.*, **9**(2), 59-69.

Green DR, Evan GI (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**(1), 19-30.

Guasch-Jané MR, Andrés-Lacueva C, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM (2006). First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb. *J. Archaeol. Sci.*, **33**(8), 1075-1080.

Guidolin D, Agnati LF, Tortorella C, Marcoli M, Maura G, Albertin G, Fuxe K (2014). Neuroglobin as a regulator of mitochondrial-dependent apoptosis: a bioinformatics analysis. *Int. J. Mol. Med.*, **33**(1), 111-116.

Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil”, *J. Pestic. Sci.*, **32**(3), 189-199.

Gupta SK, Pal AK, Sahu NP, Jha AK, Akhtar MS, Mandal SC, Das P, Prusty AK (2013). Supplementation of microbial levan in the diet of Cyprinus carpio fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil: effect on growth and metabolic responses. *Fish Physiol. Biochem.*, **39**, 1513–1524.

Gupta RC, Anadon A (2018). *Fipronil*. In: Gupta RC. (Eds) Veterinary toxicology, basic and clinical principles. London: Academic press, p: 533-538.

Gündoğdu T, Akbulut G (2019). Bromelain and Cancer. *Turkiye Klin. J. Health Sci.*, **4**, 79–84.

Hainzl D, Casida JE (1996). Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93** (23), 12764–12767.

Hanske L, Engst W, Loh G, Szczesny S, Blaut M, Braune A (2013). Contribution of gut bacteria to the metabolism of cyanidin 3-glucoside in human microbiota-associated rats. *Br. J. Nutr.*, **109**, 1433.

Harborne JB (1998). Phenolic compounds in phytochemical methods—a guide to modern techniques of plant analysis. *Springer Sci. Bus. Med.*, 66-74.

Hayasaka D, Korenaga T, Suzuki K, Saito F, Sanchez-Bayo F, Goka K (2012a). Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **80**, 355–362.

Hayasaka D, Korenaga T, Suzuki K, Sanchez-Bayo F, Goka K (2012b). Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicol.*, **21**, 421–427.

He J, Magnuson B, Giusti M (2005). Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents: Impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2859.

Heininger YMW, Poynter ME, Baeuerle PA (2000). Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 1317-1327.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**(6805), 770-6.

Heredia FJ, Francia-Aricha EM, Rivas-Gonzalo JC, Vicario IM, Santos-Buelga C (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes pH effect. *Food Chem.*, **63**, 491-498.

Horbowicz M, Kosson R, Grzesiuk A, Dębski H (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Veget. Crops Res. Bull.*, **68**, 5-22.

Hossam El Din HA, Abdallah AA, El-Dahshan AA, Abd El-baset YA, Morsy OM, Ahmed, MBM (2022). Ameliorative effects of the phytochemicals in dates (*Phoenix dactylifera*) against the toxicological changes induced by fipronil in male albino rats. *Toxicol.*, **480**, 153313.

Hu XF, Li J, Zhuang W, Li L (2010). Effect of fipronil on apoptosis rate and Bcl2 of PC12 cells., *Chinese J. Ind. Hyg. Oc. Dis.*, **28**, 264–267.

Hu H, Han T, Zhuo M, Wu LL, Yuan C, Wu L, Wang LW (2017). Elevated COX-2 expression promotes angiogenesis through EGFR/p38-MAPK/Sp1-dependent signalling in pancreatic cancer. *Sci. Rep.*, **7**(1), 470.

Huang C, Li J, Song L, Zhang D, Tong Q, Ding M, Stoner GD (2006). Black raspberry extracts inhibit benzo(a)pyrene diol-epoxide-induced activator protein 1 activation and VEGF transcription by targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Cancer Res.*, **66**(1), 5817.

Huang WY, Wang J, Liu YM, Zheng QS, Li CY (2014). Inhibitory effect of Malvidin on TNF- α -induced inflammatory response in endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **723**, 67-72.

Huang WY, Wang XN, Wang J, Sui ZQ (2018). Malvidin and its glycosides from *Vaccinium ashei* improve endothelial function by anti-inflammatory and angiotensin I-converting enzyme inhibitory effects. *Nat. Prod. Commun.*, **13**(1), 1934578X1801300115.

Hurley PM (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ. Health Perspect.*, **106**(8), 437-445.

Iosub I, Kajzar F, Makowska-Janusik MZ, Meghea A, Geana I, Rau I (2014). Electronic structure, optical and electrochemical properties of malvidin molecule extracted from grapes. *Disp. Imaging*, **1**, 175-193.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**(2), 313-322.

Jaiswal AK (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.*, **36**(10), 1199–1207.

Jan R (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.*, **9**(2), 205.

Jayashree GV, Krupashree K, Rachitha P, Khanum F (2017). Patulin induced oxidative stress mediated apoptotic damage in mice, and its modulation by green tea leaves. *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **7**, 127-134.

Jiang M, Wu YL, Li X, Zhang Y, Xia KL, Cui BW, Lian LH, Nan JX (2017). Oligomeric proanthocyanidin derived from grape seeds inhibited NF- κ B signaling in activated HSC: Involvement of JNK/ERK MAPK and PI3K/Akt pathways. *Biomed. Pharmacother.*, **93**, 674-680.

Jin ML, Park SY, Kim YH, Oh JI, Lee SJ, Park G (2014). The neuroprotective effects of cordycepin inhibit glutamate-induced oxidative and ER stress-associated apoptosis in hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicol.*, **41**, 102-111.

Johnson MH, de Mejia EG, Fan J, Lila MA, Yousef GG (2013). Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes in vitro. *Mol. Nutr. Food Res.*, **57**(7), 1182-1197.

Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM (2014). Berries: Antiinflammatory effects in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **62(18)**, 3886-3903.

Junn E, Mouradian MM (2001). Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J. Neurochem.*, **78**, 374–383.

Kashyap D, Garg VK, Tuli HS, Yerer MB, Sak K, Sharma AK, Kumar M, Aggarwal V, Sandhu SS (2019). Fisetin and quercetin: promising flavonoids with chemopreventive potential. *Biomolecules*, **9(5)**, 174.

Kaya S (2014). *Mikotoksinler, Veteriner Toksikoloji*. 3. Baskı, Ankara: Medisan Yayınevi, s: 393-433.

Kavitha K, Thiyagarajan P, Rathna J, Mishra R, Nagini S (2013). Chemopreventive effects of diverse dietary phytochemicals against DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis via the induction of Nrf2-mediated cytoprotective antioxidant, detoxification, and DNA repair enzymes. *Biochimie.*, **95(8)**, 1629-39.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26(4)**, 239-57.

Khalaf AA, Ibrahim MA, Galal MK, Abdallah AA, Mansour R, Afify MM (2020). The protective effects of Terminalia laxiflora extract on hepatonephrotoxicity induced by fipronil in male rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **27(31)**, 39507-39515.

Khan S, Jan MH, Kumar D, Telang AG (2015). Fipronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **124**, 8–14.

Ki YW, Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC (2012). Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SHSY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol. Lett.*, **211**, 18–2.

Kim R (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, **103(8)**, 1551-60.

Kim HG, Kim YR, Park JH, Khanal T, Choi JH, Do MT, Jin SW, Han EH, Chung YH, Jeong HG (2015). Endosulfan induces COX-2 expression via NADPH oxidase and the ROS, MAPK, and Akt pathways. *Arch. Toxicol.*, **89**, 2039-2050.

Kim SH, Bang J, Son CN, Baek WK, Kim JM (2018). Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates murine autoimmune arthritis through regulation of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. *Korean J. Intern. Med.*, **33(3)**, 612-621.

- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM (2017).** Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.*, **61**(1), 1361779.
- Koç E, Akçay M (2018).** Biochemical and molecular characterization of Lambda cyhalothrin in *Capoeta capoeta*. *J. Sci. Technol.*, **8**(2), 57-63.
- Konczak I, Zhang W (2004).** Anthocyanins-more than nature's colours. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2004**(5), 239–240.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003).** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **64**(5), 923-933.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005).** Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy*, **4**(4), 471-479.
- Krga I, Milenkovic D (2019).** Anthocyanins: From Sources and Bioavailability to Cardiovascular-Health Benefits and Molecular Mechanisms of Action. *J. Agric. Food Chem.*, **67**, 1771.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006).** Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, **311**, 847–851.
- Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J (1999).** pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **47**(1), 67-70.
- Laugerette F, Furet JP, Debard C, Daira P, Loizon E, G'eloën A, Soulage CO, Simonet C, Lefils-Lacourtablaise J, Bernoud-Hubac N, Bodennec J, Peretti N, Vidal H, Michalski MC (2012).** Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. *American journal of physiology. Endocrinol. Metab.*, **302**(3), E374–E386.
- Lawrence T (2009).** The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, a001651.
- LeBlanc AC (2003).** Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **27**(2), 215-29.
- Lee JE, Kang JS, Ki YW, Lee SH, Lee SJ, Lee KS, Koh HC (2011).** Akt/GSK3b signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.*, **202**, 133–141.
- Lee YM, Yoon Y, Yoon H, Park HM, Song S, Yeum KJ (2017).** Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients*, **9**(10), 1089.
- Li JH, Liu XR, Zhang Y, Tian FF, Zhao GY, Yu Q LY, Jiang FL, Liu Y (2012).** Toxicity of nano zinc oxide to mitochondria. *Toxicol. Res.*, **1**, 137-144.

- Liao YC, Chen YF, Lee TC (2015).** Increased susceptibility of H-Ras (G12V)-transformed human urothelial cells to the genotoxic effects of sodium arsenite. *Arch. Toxicol.*, **89**, 1971-1979.
- Lila MA, Burton-Freeman B, Grace M, Kalt W (2016).** Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **7**, 375–393.
- Liu T, Wang P, Lu Y, Zhou G, Diao J, Zhou Z (2012).** Enantioselective bioaccumulation of soil-associated fipronil enantiomers in *Tubifex tubifex*. *J. Hazard. Mater.*, **219-220**, 50-56.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC (2017).** NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2**, 17023.
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016).** Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol. Life Sci.*, **73(17)**, 3221-47.
- Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992).** Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, **13(12)**, 2241-2247.
- Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Camarero PR, Mougeot F, Mateo R (2015).** Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environ Sci Technol.*, **49**, 13649–13657.
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014).** The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.*, **395(2)**, 203-230.
- Lynch JW (2004).** Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol. Rev.*, **84(4)**, 1051-1095.
- Ma Q (2013).** Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**, 401-426.
- Ma Y, Li Y, Zhang H, Wang Y, Wu C, Huang W (2020).** Malvidin induces hepatic stellate cell apoptosis via the endoplasmic reticulum stress pathway and mitochondrial pathway. *Food Sci. Nutr.*, **8(9)**, 5095-5106.
- Manabe Y, Anrather J, Kawano T, Niwa K, Zhou P, Ross ME, Iadecola C (2004).** Prostanoids, not reactive oxygen species, mediate COX-2–dependent neurotoxicity. *Ann. Neurol.*, **55(5)**, 668-675.
- Manco M, Putignani L, Bottazzo GF (2010).** Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr. Rev.*, **31(6)**, 817-844.

Mani V, Hollis JH, Gabler NK (2013). Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. *Nutr. Metab.*, **10(1)**, 6.

Martin DN, Baehrecke EH (2004). Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, **131(2)**, 275-284.

May MJ, Ghosh S (1997). Rel/NF-kB and IκB proteins: an overview. *Semin. Cancer. Biol.*, **8(2)**, 63–73.

Mazza GJ (2007). Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Sanità.*, **43**, 369-374.

Merecz-Sadowska A, Sitarek P, Kowalczyk T, Zajdel K, Jęcek M, Nowak P, Zajdel R (2023). Food anthocyanins: Malvidin and its glycosides as promising antioxidant and anti-inflammatory agents with potential health benefits. *Nutrients*, **15(13)**, 3016.

Miguel MG (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.*, **25**, 291-312.

Miguel MG (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *J. Appl. Pharm. Sci.*, **1(6)**, 7-15.

Miller CG, Schmidt EE (2020). Sulfur metabolism under stress. *Antioxid. Redox Sign.*, **33(16)**, 1158-1173.

Mohamed F, Senarathna L, Percy A, Abeyewardene M, Eaglesham G, Cheng R, Azher S, Hittarage A, Dissanayake W, Sheriff MH (2004). Acute human selfpoisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil – a GABAA-gated chloride channel blocker. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **42**, 955-963.

Mueller D, Jung K, Winter M, Rogoll D, Melcher R, Richling E (2017). Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chem.*, **231**, 275.

Nagase H, Sasaki K, Kito H, Haga A, Sato T (1998). Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro. *Planta Med.*, **64(3)**, 2169.

Nagy IZ (2001). On the true role of oxygen free radicals in the living state, aging, and degenerative disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **928**, 187-199.

Nair AR, Masson GS, Ebenezer PJ, Del Piero F, Francis J (2014). Role of TLR4 in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury: Protection by blueberry. *Free Radic. Biol. Med.*, **71**, 16–25.

Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ (2010). Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic Biochem Physiol.*, **97(2)**, 149-152.

Narita M, Shimamura M, Imai S, Kubota C, Yajima Y, Takagi T, Suzuki T (2008). Role of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α -dependent expression of cyclooxygenase-2 mRNA in thermal hyperalgesia induced by chronic inflammation in mice. *Neuroscience*, **152**(2), 477-486.

Nöthlings U, Schulze MB, Weikert C, Boeing H, Van Der Schouw YT, Bamia C, Trichopoulos A (2008). Intake of vegetables, legumes, and fruit, and risk for all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in a European diabetic population. *J. Nutr.*, **138**(4), 775-781.

Neuman MG, Katz GG, Malkiewicz IM, Mathurin P, Tsukamoto H, Adachi M (2002). Alcoholic liver injury and apoptosis--synopsis of the symposium held at ESBRA 2001: 8th Congress of the European Society for Biomedical Research on Alcoholism, Paris, September 16, 2001. *Alcohol*, **28**(2), 117-28.

Nieminen R, Leinonen S, Lahti A, Vuolteenaho K, Jalonen U, Kankaanranta H, Goldring MB, Moilanen E (2005). Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. *Mediators Inflamm.*, **2005**, 249-255.

Nikolopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**(12), 3448-59.

Nizamutdinova IT, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Jeong YK, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ (2009). Anthocyanins from black soybean seed coats preferentially inhibit TNF- α -mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 through the regulation of GATAs and IRF. *J. Agric. Food Chem.*, **57**(16), 7324-30.

Oeckinghaus A, Ghosh S (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**(4), a000034.

Ohi M, Dalsenter PR, Andrade AJ, Nascimento AJ (2004). Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, **146**, 121-127.

Oliveira H, Roma-Rodrigues C, Santos A, Veigas B, Brás N, Faria A, Calhau C, de Freitas V, Baptista PV, Mateus N (2019). GLUT1 and GLUT3 involvement in anthocyanin gastric transport- Nanobased targeted approach. *Sci. Rep.*, **9**, 789.

Olsvik PA, Kristensen T, Waagbø R, Rosseland BO, Tollefsen KE, Baeverfjord G, Berntssen MHG (2005). mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comp. Biochem. Physiol. Part-C: Toxicol. Pharmacol.*, **141**(3), 314-323.

Paixao J, Dinis TC, Almeida LM (2012). Protective role of malvidin-3-glucoside on peroxynitrite-induced damage in endothelial cells by counteracting reactive species formation and apoptotic mitochondrial pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**.

Pallarès V, Fern´andez-Iglesias A, Ced´o L, Castell-Auví A, Pinent M, Ard´evol A, Salvad´o MJ, Garcia-Vallv´e S, Blay M (2013). Grape seed procyanidin extract reduces the endotoxic effects induced by lipopolysaccharide in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **60**, 107-114.

Palmer RM, Ferrige, AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327(6122)**, 524-526.

Park JH, Park YS, Lee JB, Park KH, Paik MK, Jeong M, Koh HC (2016). Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *J. Appl. Toxicol.*, **36**, 10-23.

Pascual-Teresa D, Moreno DA, García-Viguera C (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, **11(4)**, 1679-1703.

Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F (2002). The Interaction of Anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 631.

Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food 1. *FEBS Lett.*, **544**, 210-213.

Peterson JM, Feedback KD, Baas JH, Pizza FX (2006). Tumor necrosis factor- α promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **101(5)**, 1394-1399.

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol. (Camb)*, **3(4)**, 279-96.

Pondugula SR, Salamat JM, Abbott KL, Flannery PC, Majrashi M, Almaghrabi M, Govindarajulu M, Ramesh S, Sandey M, Onteru SK, Huang CC, Iwaki Y, Gill K, Narayanan N, McElroy E, Desai D, Nadar R, Moore T, Dhanasekaran M (2021). A clinically relevant combination treatment with doxorubicin and cyclophosphamide does not induce hepatotoxicity in C57BL/6J mice. *Liver Res.*, **5(4)**, 239-242.

Prior RL, Wu X (2006). Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.*, **40**, 1014-1028.

Qin F, Gao Y, Xu P, Guo B, Li J, Wang H (2015). Enantioselective bioaccumulation and toxic effects of fipronil in the earthworm *Eisenia foetida* following soil exposure. *Pest Manag. Sci.*, **71(4)**, 553-561.

Qu H, Ma R, Xue Liu D, hui Gao J, Wang F, Zhou Z, Qiang Wang P (2016b). Environmental behavior of the chiral insecticide fipronil: enantioselective toxicity, distribution and transformation in aquatic ecosystem. *Water Res.* **105**, 138–146.

Ramirez-Tortosa C, Andersen ØM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, Duthie GG (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid

peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**(9), 1033-1037.

Reen R, Nines R, Stoner G (2006). Modulation of N-nitrosomethylbenzylamine metabolism by black raspberries in the esophagus and liver of Fisher 344 rats. *Nutr. Cancer*, **54**, 47-57.

Reyes-Farias M, Vasquez K, Ovalle-Marin A, Fuentes F, Parra C, Quital V, Jimenez P, Garcia-Diaz DF (2015). Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *J. Med. Food*, **18**(5), 601-608.

Richardson H, Kumar S (2002). Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J. Immunol. Methods*, **265**(1-2), 21-38.

Romanov V, Whyard TC, Waltzer WC, Grollman AP, Rosenquist T (2015). Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation. *Arch. Toxicol.*, **89**, 47-56.

Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martinez M, Martinez-Larranaga ~ MR, Anadon A, Martinez MA (2016). Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: protection by antioxidants. *Toxicol. Lett.*, **252**, 42-49.

Roques BB, Leghait J, Lacroix MZ, Lasser F, Pineau T, Viguie C, Martin PG (2013). The nuclear receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor contribute to the impact of fipronil on hepatic gene expression linked to thyroid hormone metabolism, *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 997-1039.

Routray W, Orsat V (2011). Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **10**(6), 03-20.

Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L (2020). An overview of nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*, **25**, 5474.

Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba, T (2013). Fisetin inhibits osteoclastogenesis through prevention of RANKL-induced ROS production by Nrf2-mediated up-regulation of phase II antioxidant enzymes. *J. Pharmacol. Sci.*, **121**(4), 288-298.

Sakthivel KM, Kokilavani K, Kathirvelan C, Brindha D (2020). Malvidin abrogates oxidative stress and inflammatory mediators to inhibit solid and ascitic tumor development in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **39**(3).

Sakr S, Hamed A, Atef M (2022). Betanin ameliorates fipronil-induced nephrotoxicity via activation of Nrf2-HO-1/NQO-1 pathway in albino rat model. *Toxicol. Res.*, **11**(6), 975-986.

Salminen LE, Paul RH (2014). Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev. Neurosci.*, **25(6)**, 805-819.

Sayed AA, El-Desouky MA, Ibrahim KA (2019). Garlic and allopurinol attenuate hepatic apoptosis induced by fipronil in male albino rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **107**, 104400.

Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.*, **36**, 177-187.

Seif M, Deabes M, El-Askary A, El-Kott AF, Albadrani GM, Seif A, Wang Z (2021). Ephedra sinica mitigates hepatic oxidative stress and inflammation via suppressing the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in fipronil-treated rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **28**, 62943-62958.

Selim MA, Elsayed NM (2023). Protective effect of uncaria tomentosa extract against induced toxicity of fipronil on oral mucosa of rats (histological and immunohistochemical study). *Egypt. Dent. J.*, **69(4)**, 2671-2680.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, **293(5534)**, 1495-1499.

Seo SH, Jeong GS (2015). Fisetin inhibits TNF- α induced inflammatory action and hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human keratinocyte HaCaT cells through PI3K/Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression. *Int. Immunopharmacol.*, **29**, 246-253.

Seydi E, Mehrpouya L, Sadeghi H, Rahimi S, Pourahmad J (2021). Luteolin attenuates Fipronil-induced neurotoxicity through reduction of the ROS-mediated oxidative stress in rat brain mitochondria. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **173**, 104785.

Shi J, Wang Y, Zhang X, Fan H, Wang H, Li X, Dong Z (2023). Ameliorative effect of malvidin on spleen injury in lps-induced sepsis. *Chem. Biodivers.*, **20(8)**, e202201161.

Shih PH, Yeh CT, Yen GC (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9427-9435.

Simon LS (1999). Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am. J. Med.*, **106(5)**, 37S-42S.

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Wiemers M (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22(1)**, 5-34.

Slotkin TA, Seidler FJ (2010). Oxidative stress from diverse developmental neurotoxins: antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. *Neurotoxicol. Teratol.*, **32**, 124-131.

Smeriglio A, Barreca D, Bellocchio E, Trombetta D (2016). Chemistry, pharmacology and health benefits of anthocyanins. *Phyther. Res.*, **30**, 1265-1286.

Srinivas K, King JW, Howard LR, Monrad JK (2011). Binary diffusion coefficients of phenolic compounds in subcritical water using a chromatographic peak broadening technique. *Fluid Ph. Equilib.*, **301(2)**, 234-243.

Stehr CM, Linbo TL, Incardona JP, Scholz NL (2006). The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicol. Sci.*, **92(1)**, 270-278.

Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.*, **50(21)**, 6172-6181.

Strickland I, Ghosh S (2006). Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. *Ann. Rheum. Dis.*, **65**, iii75-iii82.

Sumedha NC, Miltonprabu S (2015). Cardiac mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by arsenic and its amelioration by diallyl trisulfide. *Toxicol. Res.*, **4**, 291-301.

Swomley AM, Butterfield DA (2015). Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics. *Arch. Toxicol.*, **89**, 1669-1680.

Taillebois E, Alamiddine Z, Brazier C, Graton J, Laurent AD, Thany SH, Le Questel JY (2015). Molecular features and toxicological properties of four common pesticides, acetamiprid, deltamethrin, chlorpyrifos and fipronil. *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 1540-1550.

Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison J, Rémésy C (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J. Nutr.*, **134**, 2275.

Tamura H, Yamagami A (1994). Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. *J. Agric. Food Chem.*, **42(8)**, 1612-1615.

Tang J, Amin Usmani K, Hodgson E, Rose RL (2004). *In vitro* metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. *Chem. Biol. Interact.*, **147**, 319-329.

Tena Pajuelo, Martín Bueno NJ, García Asuero A (2020). State of the art of anthocyanins: antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. *Antioxidants*, **9(5)**, 451.

Tingle CCD, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **176**, 1-66.

Thompson HJ, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek SM, Gillette C, O'Neill C, Conry C (1999). Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, **20(12)**, 2261-2266.

Tribble DL, Jones DP (1990). Oxygen dependence of oxidative stress. Rate of nadph supply for maintaining the GSH pool during hypoxia. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 729-736.

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.*, **25(1)**, 82-8.

Türk Gıda Kodeksi (2008). Gıda maddelerindeki bulaşanların maksimum limitleri hakkında tebliğ. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tebliğ, (2008/26).

Ucar A, Parlak V, Özgeriş FB, Yeltekin AÇ, Alak G, Atamanalp M (2020). Determination of Fipronil toxicity by different biomarkers in gill and liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **56**, 543-549.

Ucar A, Özgeriş FB, Parlak V, Yeltekin AÇ, Kocaman EM, Alak G, Atamanalp M (2022). Neurotoxic responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to fipronil: multi-biomarker approach to illuminate the mechanism in brain. *Drug Chem. Toxicol.*, **45(5)**, 2140-2145.

Vanzo A, Terdoslavich M, Brandoni A, Torres A, Vrhovsek U, Passamonti S (2008). Uptake of grape anthocyanins into the rat kidney and the involvement of bilitranslocase. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 1106.

Vidau C, Gonzalez-Polo RA, Niso-Santano M, Gomez-Sanchez R, Bravo-San Pedro JM, Pizarro-Estrella E, Blasco R, Brunet JL, Belzunces LP, Fuentes JM (2011). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicol.*, **32**, 935-943.

Wang H, Cao G, Prior RL (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, **45(2)**, 304-309.

Wang XZ, Liu SS, Sun Y, Wu JY, Zhou YL, Zhang JH (2009). Beta-cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology*, **72(5)**, 599-611.

Wang XQ, Li YG, Zhong S, Zhang H, Wang XY, Qi PP, Xu H (2013). Oxidative injury is involved in fipronil-induced G2/M phase arrest and apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pest. Biochem. Physiol.*, **105**, 122-130.

Wang X, Martínez MA, Wu Q, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, Yuan Z (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.*, **46(10)**, 876-899.

- Wang X, Jin C, Zhong Y, Li X, Han J, Xue W, Wu P, Xia X, Peng X (2018).** Glutathione reduction of PAT-evoked cytotoxicity in HEK293 cells by the prevention of oxidative damage and the mitochondrial apoptotic pathway. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 7775-7785.
- Wang Z, Gao Y, Huang X, Huang S, Yang X, Wang J, Zheng N (2021).** Metabolomics analysis underlay mechanisms in the renal impairment of mice caused by combination of aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Toxicol.*, **458**, 152835.
- Wasef L, Nassar AMK, El-Sayed YS, Samak D, Noreldin A, Elshony N, Saleh H, Elewa YHA, Hassan SMA, Saati AA (2021).** The potential ameliorative impacts of cerium oxide nanoparticles against fipronil-induced hepatic steatosis. *Sci. Rep.*, **11**(1), 1310.
- Watanabe T, Sekine S, Naguro I, Sekine Y, Ichijo H (2015).** Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. *J. Biol. Chem.*, **290**, 10791-10803.
- Wei H, Li H, Wan SP, Zeng QT, Cheng LX, Jiang LL, Peng YD (2017).** Cardioprotective effects of malvidin against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: A mechanistic study. *Med. Sci. Monit.*, **23**, 2007.
- Weidinger A, Kozlov AV (2015).** Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, **5**, 472–484.
- Weston DP, Lydy MJ (2013).** Toxicity of the insecticide fipronil and its degradates to benthic macroinvertebrates of urban streams. *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 1290-1297.
- WHO, G (2010).** The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009.
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J (2005).** Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Technol.*, **16**(9), 423-428.
- Woodward KN (2012).** *Mammalian toxicology of insecticides*. In: Marrs TC. (Eds), *Veterinary Pesticides*. Cambridge, RSC Publ, p: 348-426.
- Xiao D, Sandhu A, Huang Y, Park E, Edirisinghe I, Burton-Freeman B (2017).** The effect of dietary factors on strawberry anthocyanins oral bioavailability. *Food Funct.*, **8**, 3970.
- Xie C, Kang J, Ferguson ME, Nagarajan S, Badger TM, Wu X (2011).** Blueberries reduce pro-inflammatory cytokine TNF- α and IL-6 production in Mouse macrophages by inhibiting NF- κ B activation and the MAPK pathway. *Molecular Food Nutr. Res.*, **55**(10), 1587-1591.

Xu GW, Yao QH, Weng QF, Su BL, Zhang X, Xiong JH (2004). Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **36**(1), 101-104.

Xu W, Zhou Q, Yao Y, Li X, Zhang JL, Su GH, Deng AP (2016). Inhibitory effect of Gardenblue blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) anthocyanin extracts on lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response in RAW 264.7 cells. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **17**(6), 425-436.

Xu H, Zhang J, Huang H, Liu L, Sun Y (2018). Malvidin induced anticancer activity in human colorectal HCT-116 cancer cells involves apoptosis, G2/M cell cycle arrest and upregulation of p21WAF1. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **11**(3), 1734-1741.

Yadav A, Mishra PC (2013). Modeling the activity of glutathione as a hydroxyl radical scavenger considering its neutral non-zwitterionic form. *J. Mol. Model.*, **19**, 767-777.

Yang HY, Lee TH (2015). Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep.*, **48**, 200-208.

Yoshimura A (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumour development. *Cancer Sci.*, **97**, 439-447.

Yuan S, Akey CW (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, **21**(4), 501-15.

Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F (2013). Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.*, **100**, 30-47.

Zhang T, Lv C, Chen L, Bai G, Zhao G, Xu C (2014). Encapsulation of anthocyanin molecules within a ferritin nanocage increases their stability and cell uptake efficiency. *Food Res. Int.*, **62**, 183.

Zhang B, Xu Z, Zhang Y, Shao X, Xu X, Cheng J, Li Z (2015). Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. *Pest. Biochem. Physiol.*, **119**, 81-89.

Zhang J, Celli GB, Brooks MS (2019). *Natural sources of anthocyanins*. In: Brooks MS, Celli GB. (Eds.), *Anthocyanins from natural sources: Exploiting targeted delivery for improved health* (Vol. 12). Birmingham, UK: Royal Society of Chemistry, p:1-33.

Zhao BX, Sun YB, Wang SQ, Duan L, Huo QL, Ren F, Li GF (2013). Grape seed procyanidin reversal of p-glycoprotein associated multi-drug resistance via down-regulation of NF- κ B and MAPK/ERK mediated YB-1 activity in A2780/T cells. *PloS One*, **8**(8), e71071.

Zheng F, Wang YZ, Wu YX, Zhang MY, Li FT, He Y, Yue H (2021). Effect of stabilization malvids anthocyanins on the gut microbiota in mice with oxidative stress. *J. Food Biochem.*, **45(12)**, 4892-4902.

Zhou F, Sun W, Zhao M (2015). Controlled formation of emulsion gels stabilized by salted myofibrillar protein under malondialdehyde (MDA)- induced oxidative stress. *J. Agric. Food. Chem.*, **63**, 3766–3777.

Zou W, Zhang C, Gu X, Li X, Zhu H (2021). Metformin in combination with malvidin prevents progression of non-alcoholic fatty liver disease via improving lipid and glucose metabolisms, and inhibiting inflammation in type 2 diabetes rats. *Drug Des. Devel Ther.*, 2565-2576.

Zunino SJ, Pearson JM, Freytag TL, Breksa AP, Bonnel EL, Woodhouse LR, Storms DH (2014). Dietary grape powder increases IL-1 β and IL-6 production by lipopolysaccharide-activated monocytes and reduces plasma concentrations of large LDL and large LDL-cholesterol particles in obese humans. *Br. J. Nutr.*, **112(3)**, 369-380.

toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stres ve antioksidanlar. Türkiye klinikleri veteriner bilimleri farmakoloji ve toksikoloji dergisi.

2. **Sahindokuyucu-Kocasari F, Garli S, Erdemli-Kose SB (2021).** Hayvanlarda ilaç ve toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stresin kardiyovasküler ve hematopoietik sistem toksisitesindeki rolü. İlaç ve toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stres ve antioksidanlar. Türkiye klinikleri veteriner bilimleri farmakoloji ve toksikoloji dergisi.
3. **Kocasari ř, Erdemli-Kose SB, Garli S (2021).** Hayvanlarda ilaç ve toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stresin sindirim ve solunum sistemi toksisitesindeki rolü. İlaç ve toksik maddelere bağlı olarak oluşan oksidatif stres ve antioksidanlar. Türkiye klinikleri veteriner bilimleri farmakoloji ve toksikoloji dergisi.
4. **Sahindokuyucu-Kocasari F, Erdemli-Kose SB, Garli S (2021).** Akut toksisite testleri. Toksisite testleri. Türkiye klinikleri veteriner bilimleri farmakoloji ve toksikoloji dergisi.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler:

1. **Yaman S, ztrk D, Garli S (2022).** Pochonia Chlamydosporiaand Colletotrichum Higginsianum Isolation in New Zealand White Rabbits, 9.International Conference Onagriculture, Animal Sciencesandrural Development.
2. **Kıyıcı R, Akkan HA, Karaayvaz BK, Karaca M, zyıldız Z, Kart A, Garlı S (2022).** Investigation of The Effects of OrallyAdministered Sweetgum Oil to Wistar Rats on Liver and Kidney, 9.International Conference Onagriculture, Animal Sciencesandrural Development.

