



**SUBAKUT METAFİLUMİZON UYGULAMASININ LİPİD
PEROKSİDASYON, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE VE
DOKULAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ERKEK
RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

Ezgi Nur DEMİRKAPI

Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL

Tez No: 2022-001

Afyonkarahisar

**SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SUBAKUT METAFİLUMİZON UYGULAMASININ LİPİD
PEROKSİDASYON, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE VE DOKULAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ERKEK RATLARDA
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Ezgi Nur DEMİRKAPI**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL**

Tez No:

2022-001

AFYONKARAHİSAR

**Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları
Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “20. SAĞ. BİL.23”**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı'nda** Ezgi Nur DEMİRKAPI tarafından hazırlanan “Subakut Metaflumizon Uygulamasının Lipid Peroksidasyon, Antioksidan Aktivite ve Dokular Üzerindeki Etkilerinin Erkek Ratlarda Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 19/ 01/ 2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

Üye

Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esma KOZAN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

28/ 01/ 2022

Ezgi Nur DEMİRKAPI

ÖZET

SUBAKUT METAFİUMİZON UYGULAMASININ LİPİD PEROKSİDASYON, AKTİOKSİDAN AKTİVİTE VE DOKULAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ERKEK RATLARDA ARAŞTIRILMASI

Yapılan tez çalışmasında sodyum kanalı bloke edici insektisit çeşidi olan Metaflumizon (MTF)'un erkek ratlarda lipid peroksidasyon, antioksidan aktivite düzeyleri, karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Uygulama için Afyon Kocatepe Üniversitesi Etik Kurul'undan 49533702/189 sayılı onay alınarak başlandı. Çalışmada 300-350 g 10-12 haftalık toplam 32 Sprague Dawley erkek rat, her kafesde 8'erli hayvan olacak şekilde rastgele örnekleme yöntemiyle 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna fizyolojik su, ikinci gruba 50 mg/kg MTF, üçüncü gruba 100 mg/kg ve son gruba 200 mg/kg MTF gastrik gavaj yoluyla oral olarak 28 gün boyunca uygulandı. Çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre MTF'un artan dozlarda uygulamasının eritrosit örneklerinde, karaciğer, böbrek ve beyin dokularında malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) seviyelerinin anlamlı derecede ($p<0,05$) arttığı, glutatyon (GSH) seviyelerinin ise azaldığı belirlendi. Ek olarak artan dozlarda MTF uygulaması ile plazma aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) , üre, kreatinin, total protein ve glukoz seviyelerinin anlamlı derecede ($p<0,05$) arttığı rapor edildi. Bunlara ek olarak MTF₅₀, MTF₁₀₀ ve MTF₂₀₀ gruplarında karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokularında hasara ilişkin histopatolojik değişiklikler ile hücre ölümünü gösteren apoptotik bulguların olduğu belirlenmiştir. Tez çalışması sonucunda elde edilen bulgulara göre MTF'un ratlarda oksidatif stresini indüklediği ve karaciğer, böbrek ve beyin dokuları üzerinde histopatolojik hasarlar meydana getirdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnsektisit, Metaflumizon, Oksidatif stres, Lipid peroksidasyon, Antioksidan aktivite, Akut toksisite

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SUBACUTE METAFLUMISONE ADMINISTRATION ON LIPID PEROXIDATION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TISSUES IN MALE RATS

In the thesis study, it was aimed to investigate the effects of Metaflumizon (MTF), a sodium channel blocking insecticide, on lipid peroxidation, antioxidant activity levels, liver, kidney and brain tissues in male rats. The application was started with the approval numbered 49533702/189 from the Afyon Kocatepe University Ethics Committee. In the study, a total of 32 Sprague Dawley male rats, 300-350 g, 10-12 weeks old, were randomly divided into 4 groups with 8 animals in each cage. Physiological water was administered to the control group, 50 mg/kg MTF to the second group, 100 mg/kg to the third group, and 200 mg/kg MTF to the last group by gastric gavage for 28 days orally. When the data obtained at the end of the study were evaluated, compared to the control group, the application of MTF in increasing doses increased the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) significantly ($p<0.05$) in erythrocyte samples, liver, kidney and brain tissues. It was determined that glutathione (GSH) levels decreased. In addition, it was reported that plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine, total protein and glucose levels increased significantly ($p<0.05$) with increasing doses of MTF. In addition, it was determined that histopathological changes related to damage to liver, kidney, testis and brain tissues and apoptotic findings indicating cell death occurred in MTF₅₀, MTF₁₀₀ and MTF₂₀₀ groups. According to the findings obtained as a result of the thesis study, it was determined that MTF induced oxidative stress in rats and caused histopathological damage on liver, kidney and brain tissues.

Keywords: Insecticide, Metaflumizone, Oxidative stress, Lipid peroxidation, Antioxidant activity, Acute toxicity

ÖNSÖZ

Tezimin planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL'e ve Prof. Dr. Sinan İNCE'ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Yüksek Lisans eğitimim sırasındaki değerli katkılarından dolayı da Prof.Dr. Abdullah ERYAVUZ, Prof. Dr. Recep ARSLAN ve Arş. Gör. Hülya ATİK'e, tez çalışmamın gerçekleşmesinde rol alan Afyon Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim. Son olarak her zaman yanımda olan ve beni bu günlere getiren aileme ve hep yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür etmeyi borç bilirim.

Ezgi Nur DEMİRKAPI

Afyonkarahisar

2022

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	I
SUMMARY	II
ÖNSÖZ SAYFASI	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER	VIII
ÇİZELGELER	IX
RESİMLER	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Bilgi	2
1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması	4
1.3. Yaygın Olarak Kullanılan İnsektisit Türleri	5
1.3.1.Klorlu Hidrokarbonlar	5
1.3.2.Organik Fosforlu	5
1.3.3.Karbamatlar	6
1.3.4.Piretiroidler	6
1.4. Metaflumizon	7
1.5. Metaflumizon Etki Mekanizmaları	9
1.6. Serbest Radikal	10
1.7. Oksidatif Stres	11
1.8. Apoptoz ve Nekroz Tanımı	14
1.8.1.Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları	16
1.8.1.1.Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis	16
1.8.1.2. Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptoz	17
1.8.2. Apoptoz Saptama Yöntemleri	18
1.8.2.1.TUNEL metodu ile DNA fragmentasyonunun belirlenmesi	19
1.8.2.2.In situ hibridizasyon tekniği	19
1.8.2.3.Annexin V yöntemi	20
1.8.2.4.Apoptoza özgü proteinlerin saptanması	20

2. MATERYAL ve METOT	21
2.1. Materyal	21
2.1.1. Araç ve Gereçler	21
2.1.2. Hayvan Materyali	22
2.2. Metot	22
2.2.1. Deneysel Aşama	22
2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlaması ve Uygulanması	22
2.2.1.2. Deneysel Aşamanın Sonlandırılması	23
2.2.2. İntrakardiyak Kan Alımı, Sakrifikasyon Ve Alınan Örneklerin Saklanması	23
2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler	24
2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu	24
2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması	24
2.2.4. Tam Kan ve Doku Homojenatlarında Malondialdehit (MDA) Ölçümü	25
2.2.5. Tam Kan ve Doku Homojenatlarında Glutasyon (GSH) Ölçümü	26
2.2.6. Eritrosit Lizatında ve Doku Homojenatlarında Süperoksit Dismutaz (SOD) Ölçümü	26
2.2.7. Eritrosit Lizatında ve Doku Homojenatlarında Katalaz (CAT) Ölçümü	28
2.2.8. Hemogloblin (Hb) ve Protein Konsantrasyonları Ölçümü	28
2.2.9. Plazma Biyokimyasal Parametreleri	29
2.2.10. Histopatolojik Analizler için Dokuların Hazırlanması	29
2.2.11. Doku Örneklerinin Hazırlanması	29
2.2.12. Hemotoksilen Eosin Boya Protokolü	30
2.2.13. İmmunohistokimyasal İncelemeler	31
2.2.13.1. TUNEL Boyama Protokolü	31
2.2.14. İstatiksel Analiz	33
3. BULGULAR	34
3.1. Lipid Peroksidasyonu ve Aktif Glutasyon (GSH) Seviyeleri Üzerine Etkileri	34
3.2. Antioksidan enzim seviyeleri üzerindeki etkileri	35
3.3. Plazmadaki biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri	37
3.4. Klinik Bulgular	40
3.5. Canlı Ağırlık Artışı	41
3.6. Patolojik Değişiklikler	41
3.6.1. Makroskopik Bulgular	41
3.6.1.1. Kontrol Grubu	42
3.6.1.2. MTF ₅₀ Grubu	42
3.6.1.3. MTF ₁₀₀ Grubu	42

3.6.1.4. MTF ₂₀₀ Grubu	42
3.6.2. Histopatolojik Bulgular	43
3.6.2.1. Kontrol Grubu	44
3.6.2.2.MTF ₅₀ Grubu	46
3.6.2.3.MTF ₁₀₀ Grubu	49
3.6.2.4. MTF ₂₀₀ Grubu	52
3.6.3. İmmunohistokimyasal Bulgular	59
3.6.3.1. Kontrol Grubu	59
3.6.3.2. MTF ₅₀ Grubu	61
3.6.3.3. MTF ₁₀₀ Grubu	63
3.6.3.4. MTF ₂₀₀ Grubu	65
4.TARTIŞMA	68
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	78
6.KAYNAKLAR	79
7.EKLER	87
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	87
7.2. Anket Formu	87
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

ALP: Alkalen fosfataz

ALT: Alanin aminotransferaz

Apaf-1: Proteaz aktive edici faktör 1

AST: Aspartat aminotransferaz

BUN: Kan Üre Nitrojeni

CAT: Katalaz

CTL: Sitotoksik T hücreleri

DCJW: N- dekarbokmetoksile indoksakarb

FasL: Fas Ligandı

GSH: İndüklenmiş glutatyon

MDA.: Malondialdehit

MTF: Metaflumizon

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

SCBI: Sodyum kanalı bloke edici insektisit

SOD: Süper oksit dismutaz

TNFR: Tümör nekroz faktör reseptör

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil 3.1. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma AST düzeyleri üzerine etkisi	37
Şekil 3.2. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma ALT düzeyleri üzerine etkisi	38
Şekil 3.3. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma ALP düzeyleri üzerine etkisi	38
Şekil 3.4. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma Üre düzeyleri üzerine etkisi	39
Şekil 3.5. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma Kreatinin düzeyleri üzerine etkisi	39
Şekil 3.6. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma Glukoz düzeyleri üzerine etkisi	40
Şekil 3.7. 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma Total protein düzeyleri üzerine etkisi	40

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 3.1. Metaflumizon'un 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların tam kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki MDA seviyeleri üzerine etkisi	34
Çizelge 3.2. Metaflumizon'un 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların tam kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki GSH seviyeleri üzerine etkisi	35
Çizelge 3.3. Metaflumizon'un 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki SOD seviyeleri üzerine etkisi	35
Çizelge 3.4. Metaflumizon'un 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki CAT seviyeleri üzerine etkisi	36
Çizelge 3.5. Canlı ağırlık değişimleri	41
Çizelge 3.6. 50, 100, 200 mg/kg dozlarda Metaflumizon uygulamasının ratlar da karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularının histopatolojisinin istatistiksel değerlendirilmesi	57
Çizelge 3.7. TUNEL boyama yöntemi ile belirlenen immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistik verileri	67

RESİMLER

	SAYFA
Resim 3.1. Kontrol grubu ratların karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	44
Resim 3.2. Kontrol grubu ratların böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	45
Resim 3.3. Kontrol grubu ratların testis dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	45
Resim 3.4. Kontrol grubu ratların beyin dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	46
Resim 3.5. MTF ₅₀ grubu ratların karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	47
Resim 3.6. MTF ₅₀ grubu ratların böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	48
Resim 3.7. MTF ₅₀ grubu ratların testis dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	48
Resim 3.8. MTF ₅₀ grubu ratların beyin dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	49
Resim 3.9. MTF ₁₀₀ grubu ratların karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	50
Resim 3.10. MTF ₁₀₀ grubu ratların böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	51
Resim 3.11. MTF ₁₀₀ grubu ratların testis dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	51
Resim 3.12. MTF ₁₀₀ grubu ratların beyin dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	52
Resim 3.13. MTF ₂₀₀ grubu ratların karaciğer dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	54
Resim 3.14. MTF ₂₀₀ grubu ratların böbrek dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	55
Resim 3.15. MTF ₂₀₀ grubu ratların testis dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	55
Resim 3.16. MTF ₂₀₀ grubu ratların beyin dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	56
Resim 3.17. Kontrol grubu ratların karaciğer dokularının TUNEL(-) değerlendirilmesi	59
Resim 3.18. Kontrol grubu ratların böbrek dokularının TUNEL(-) değerlendirilmesi	60
Resim 3.19. Kontrol grubu ratların testis dokularının TUNEL(-) değerlendirilmesi	60

değerlendirilmesi

Resim 3.20. MTF₅₀ grubu ratların karaciğer dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 61

Resim 3.21. MTF₅₀ grubu ratların böbrek dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 62

Resim 3.22. MTF₅₀ grubu ratların testis dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 62

Resim 3.23. MTF₁₀₀ grubu ratların karaciğer dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 63

Resim 3.24. MTF₁₀₀ grubu ratların böbrek dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 64

Resim 3.25. MTF₁₀₀ grubu ratların testis dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 64

Resim 3.26. MTF₂₀₀ grubu ratların karaciğer dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 65

Resim 3.27. MTF₂₀₀ grubu ratların böbrek dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 66

Resim 3.28. MTF₂₀₀ grubu ratların testis dokularının TUNEL(+) değerlendirilmesi 66

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ile birlikte canlılar kimyasallara daha fazla maruz kalmaktadır. Teknolojinin ilerlemesinin birçok alanda faydası olduğu gibi her yıl binlerce kimyasal üretilip piyasada kullanılmaktadır. Farklı alanlarda üretilen bu kimyasallara insanlar doğrudan veya dolaylı yollarla maruziyet sonucunda farklı sağlık sorunları meydana gelmektedir.

Artan nüfusla beraber gıda ihtiyaçları da doğru orantılı olarak artmıştır. Beslenme gereksiniminin karşılanması amacıyla tarımda üretim sırasında oluşan kayıpları en aza indirmek için kullanılan kimyasallar pestisit olarak adlandırılır (Kim vd.,2017). Üretimde oluşan bu kayıpların nedeni zararlı haşereler, yabancı otlar veya diğer zararlılar olabilmektedir. Pestisitler etki mekanizmalarına göre sınıflandırılan kimyasal ilaçlardır. Böcekler üzerinde etkili olanlar insektisit, istenmeyen otlar üzerinde etkili ilaçlar herbisit ve mantarlar üzerinde etkili olanlar ise fungusitler olarak bilinmektedir (Akdoğan vd.,2012).

Zararlı böcekler tarafından tarım da oluşan ürün hasarlarını en aza indirmek, insanlar ve evcil hayvanlar üzerinde toksik metabolit üreten canlıları kontrol altına almak için insektisitler yaygın olarak kullanılmaktadır (Mossa vd.,2018). İnsektisitler hedef organizmalar üzerinde öldürücü özelliğe sahip olmalarına karşın bilinçsiz ve yüksek dozlar da kullanım sonucu hedef olmayan organizmalar üzerinde de olumsuz sonuçlar meydana getirdikleri birçok çalışma sonucunda belirlenmiştir (Hanazato., 2001; Alavanja vd., 2004; Braak vd., 2018).

Yapılan tez çalışmasında bir insektisit çeşidi olan Metaflumizonun Wistar-albino ratlar üzerindeki subakut uygulanması sonucunda etkilerinin araştırılması amaçlandı.

1.1 Literatür Bilgi

Pestisitler dünya genelinde insanlar tarafından evlerde, işyerlerinde veya tarımda sıklıkla kullanılmaktadır. Evlerde veya işyerlerinde haşerelerle mücadelede tarımda ise üretim, depolama ve hasat zamanı zararlı böceklerle karşı yaygın olarak tercih edilen böcek öldürücülere insanlar da maruz kalmaktadır (Vidyasagar vd.,2004). Gelişmiş ülkelerde sıklıkla kullanılan pestisitler, omurgalılar üzerinde farklı olumsuz etkilere neden olmakla beraber genel de nörotoksik ajanlar olarak bilinmektedirler (Gupta vd.,2019; Berny, 2007).

1850'lerden önce arsenik ve borik asit gibi inorganik yapıdaki böcek ilaçlarının kullanımı yaygın ve etkili sonuçlar oluştururken zaman için de gelişen sanayi ile kimyasal üretim faaliyetlerinin artması sonucunda 1930'larda sentetik böcek öldürücü ilaçlar keşfedilmeye başlandı (Casida, 2009). Müller tarafından 1939'da DDT'nin böcek öldürücü aktivitesi tespit edildi. Klorlanmış insektisit türünün keşfi 1940-1970 yılları arasında büyük bir ilgiyle karşılandı. 1970 yılından sonra birçok ülkede klorlanmış insektisit kullanımı önemli ölçüde azalmaya başlanmasının ardından canlılar üzerinde kalıcı ve zararlı etkilerinin daha az olduğu düşünülen organikfosforlu insektisitlerin üretimi yaygınlaştı (Le Goff ve Giraudo.,2019).

Pestisitler de diğer ksenobiyotikler gibi vücutta bir takım enzimatik olaylara katılmaktadır. Enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre 4 ana grupta sınıflandırılırlar. Bunlar; oksidasyon, redüksiyon, kopma ve konjugasyon aşamalarından oluşmaktadır. Bunlardan ilk üçü faz I aşaması olarak bilinirken, konjugasyon faz II aşamasını oluşturmaktadır. Pestisitler, faz I aşamasında karaciğerde sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından oksidasyona uğrayarak biyolojik yarı ömrü kısa olan polar bileşiklere dönüşmektedir. Faz II aşamasında ise değişime uğrayan pestisitler sudaki polariteleri yüksek olan glukuronik aside ya da glutatyon (GSH)'na konjuge olmaktadır. Pestisit biyotransformasyonu sonucunda biyoaktivasyona uğrayan pestisit metabolitleri doku makromoleküllerine (DNA, protein) kovalent olarak bağlanarak biyolojik yarı ömürlerini artırırlar. Yarı ömürleri artan pestisit metabolitleri DNA gibi önemli hücresel makromoleküllere ya da

nörolojik önemi olan esterazlara bağlanmasıyla onkojenik ya da nörotoksik anormalliklere sebep olmaktadır (Kurutaş ve Kılınç, 2003).

Son yıllarda, insanlar hızla gelişen teknoloji sayesinde geniş spektrumlu çeşitli kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Bu kimyasal madde gruplarından birisi de pestisitlerdir.

Pestisitlerin etki biçimleri türe özgü olmadığından dolayı, çeşitli yollar aracılığı ile (örn. yiyecek ve içme suyunda kalıntılar tarzında) maruz kalınması durumunda bu kimyasal maddelerle ilişkili canlı organizmalar üzerinde riskler ortaya çıkmaktadır (Abdollahi, vd., 2004). Bu tür tehlikeler arasında cilt ve göz tahrişi, baş ağrısı, baş dönmesi ve mide bulantısı gibi kısa süreli etkilerden başka; kanser, astım ve diyabet gibi kalıcı birçok kronik bozukluklara da neden oldukları bilinmektedir. (Kim vd.,2017). Pestisitlere maruziyet dermal, ağız, göz ve solunum yolları olmak üzere dört temel yol ile karşımıza çıkmaktadır (Lushchak vd.,2018). Pestisitlerle zehirlenme durumlarına en yüksek oranda ağız yoluyla; en düşük olarakta dermal maruziyetle karşı karşıya kalınabildiği belirlenmiştir. Uçucu bileşenlerinin varlığı nedeniyle, solunum maruziyeti potansiyeli de yüksek olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lushchak vd.,2018).

Pestisitlerin hedef ve hedef olmayan canlı organizmalarda birikerek farklı zararlı etkilerinin olduğu birçok çalışma sonucunda belirlenmiştir. Bu kimyasallara maruz kalınması sonucunda oluşacak farklı etkilerin organizmadaki metabolik yollara bağlı olduğu bildirilmiştir. Vücuttan uzaklaştırılması orijinal formunda ya direkt olarak veya organizma tarafından farklı bileşiklerle konjugasyon aşamasından sonra biyotransformasyona uğratarak iki farklı yol ile gerçekleşebilmektedir (Lushchak vd.,2018). Birçok çevresel kirletici maddenin veya metabolitlerinin oksidatif stresi indüklemesi sonucunda toksik etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS), belirli metabolik yolların iyi bilinen yan ürünleri olarak görev almalarının yanı sıra; belirli bileşiklerin otooksidasyonu sonucunda konsantrasyonları çeşitli koşullar altında akut veya kronik olarak yükselebilmekte ve oksidatif stresin gelişmesine sebep olabilen aktif moleküller olarak

nitelendirilmektedirler.

ROS özellikle enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu ve sonuçta da nekroz veya apoptozis yoluyla hücre ölümüne yol açabilecek sitotoksik etkileri dahil olmak üzere önemli hücresel makromoleküllerle reaksiyona girebildikleri için aktif biyomoleküller olarak nitelendirilmektedir (Lushchak vd.,2018).

1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, tarımda hastalıkların yanı sıra ürün kayıplarını da önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan etkili maddelerden biri olarak bilinmektedir. Fakat bilinçsiz ve aşırı kullanım nedeniyle ticari pestisit ürünlerine karşı böceklerde bağışıklık gelişebilmektedir. Son zamanlarda birden fazla türü hedef alan pestisitler geliştirilmiştir (Speck-Planche vd., 2012). Günümüzde, kimyasal pestisitler ve insektisitler, ürün zararlılarını ortadan kaldırmak amacıyla yaygın bir şekilde kimyasal bir ajan olarak sıkça kullanım sahası bulmaktadır (Gentz vd., 2010). Pestisitlerin etkileri nüfus üzerinde, maruz kalma ve toksisitenin yanı sıra yaşam öyküsü, özellikleri, uygulama zamanı, popülasyon yapısı gibi farklı faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Schmolke vd., 2010).

Pestisitler, böcek, mantar, kemirgen ve yumuşakça öldürücüler ile herbisitler, nematitler, bitki büyüme düzenleyicileri ve diğerleri dahil olmak üzere etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmışlardır. Pestisitlerin düzensiz kullanımı nedeniyle insan sağlığı ve biyoçeşitlilik düzeyinde önemli endişelere yol açabilmektedir (Agarwal vd., 2015). Pestisitlerin suda daha çözünabilir, ısıya dayanıklı ve polar yapıda oldukları düşünülmektedir, bu özelliklerinden dolayı da doğadaki toksik etkilerini azaltmak zorlaşmaktadır. Pestisitler sadece hedef organizmalar üzerinde toksik etkiye sahip değildir. Ayrıca endüstrilerde ve halk sağlığı alanlarında da kullanılmakta olup bu kimyasal bileşiklere maruz kalan birçok canlı türü üzerinde özellikle de insanlar için potansiyel toksik etkilere neden olmakta

ve risk taşımaktadırlar. Hedef türe bağılı olarak pestisitler doğal flora, doğal fauna ve su yaşamında da toksisitelere neden olabilirler (Rashid vd.,2010).

1.3.Yaygın Olarak Kullanılan İsektisit Türleri

Böceklerle mücadele de yaygın olarak kullanılan 4 temel grup insektisit bulunmaktadır. Bunlar Organik klorlu (siklodienler, diklordifenoltrikloreten (DDT) vb), Pyrethroidler, Organik fosforlu (kloropirifus, fention vb) ve Karbamatlar (aldikarb, metiyokarb vb) sınıfı başta olmak üzere gruplandırılmaktadır. Birçoğunun etki mekanizması başlıca sinir sistemi üzerine etki gösterse de böcek türlerine göre farklılık gösteren toksisitelere de sahiptirler.

1.3.1. Klorlu Hidrokarbonlar

Organik klorlu insektisitler ya da başka bir deyimle klorlu hidrokarbonlar çeşitli hidrokarbonların belli bir oranda klorlandırılması ile elde edilen böcek ilaçları olarak kabul edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan organik klorlu hidrokarbon insektisitlerinden birisi olan DDT ilk kez 1942 yılında Amerika’da insektisit olarak kullanım sahasına girmiştir (Tuncer,1986).

1.3.2. Organik Fosforlu

Organik fosforlu kimyasal ajanlar özellikle bitki suları ile beslenen yaprak biti ve akar gibi böcekler üzerinde etkili olmakla birlikte çok yönlü olarak böcek öldürücü ilaç grubu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Organik fosforlu insektisitlerin canlılar üzerindeki etki mekanizması kolin esterase enziminin substratı olan asetil

kolin gibi benzer yapıda işlev oluşturarak yapısal bütünleşme sağlamaktadır (Çakır ve Yamaner.,2005). Organik fosforlu insektisitlerin inhalasyon sonucunda sinir sisteminde asetilkolinesteraz (kolinesteraz) enziminin inhibisyonu sonucu toksik etkiye neden olduğu da yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Akdoğan vd.,2012).

1.3.3. Karbamatlar

Karbamat grubu insektisitler asetilkolinesteraz enziminin aktif kısmı olan serin hidroksil ucuna geçici olarak bağlanıp kolinesteraz enzimini inhibe etmektedir (Çakır ve Yamaner., 2005). Asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu ile asetilkolinin parasempatik efektör bölgelerin de, nöromüsküler kavşakta ve sinapslar gibi sinir sisteminin farklı bölgelerinde birikime neden olması dolayısıyla enzimin işlevi yetersiz kalmaktadır.

1.3.4. Piretroidler

Piretroidler Oleoresinin krizentam bitkisinden elde edilerek piretrinlerin sentetik analogları şeklinde böcek ilacı olarak kullanımları son yıllarda yaygınlaşmıştır. Tip I piretroidler yapısal olarak siklopropan karboksilik asit esterlerinden oluşurken tip II piretroidlerde siyano grup eklenerek insektisit özellik kazanmıştır (Haya, 1989).

Organofosforlu insektisitlere göre daha az kalıcı etkilere sahip iken etki mekanizmaları benzer olup piretroidler sodyum kanallarının geçirgenliği üzerinden gösterirler ve bu etkiye böceklerin duyarlılığı oldukça yüksektir.

1.4. Metaflumizon

Kimyasal adı (EZ)-2'-[2-(4-siyanofenil)-1-(α,α,α -trifloro-m-tolil)-etiliden]-4-(triflorometoksi) karbanilhidrazid olan Metaflumizon (MTF) semikarbazon yapısında bir insektisittir (Casida, 2009). MTF'nin iki metaboliti; M320I123 (4-{5-hidroksi-3-okso-4-[4(triflorometoksi) fenil] -6- [3-(triflorometil-)fenil]-2,3,4,5-tetrahidro-1,2,4-triazin-5-il}benzonitril) ve M320I29 (m-triflorometil benzoik asit) olarak belirlenmiştir. Bu bileşik şuan da BASF Aktiengesellschaft Fort Dodge Hayvan Sağlığı bölümü tarafından birlikte geliştirilme sürecindedir. MTF coleoptera, hemiptera, hymenoptera, diptera, isoptera ve siphonaptera gibi lepidoptera zararlıları üzerinde etkili böcek ilacı olarak bilinmektedir (Salgado ve Hayashi,2007). MTF'nin E ve Z olarak iki tane izomer yapıları bulunmaktadır. Bu yapıların karışımlarının oranı 90:10 (E:Z) olarak belirlenmiştir (EFSA). Semikarbazon yapıli insektisit olan MTF 3-fenil-1-fenilkarbamoil-2-pirazolinlerden gelişen 3,4-difenil-1-fenilkarbamoil-2-pirazolinlerin yapısına sahip açık halka analogudur. Suda çözünürlüğü düşük olmasına rağmen yağda çözünme özelliği aktif bir kimyasal olarak bilinmektedir.

Pirazolinlerin hedef şekli voltaja bağlı sodyum kanallarını bloke ederek böceklerin sinir sistemini felç etmekte ve sinir aktivitelerini durdurucu etki göstermektedir. Sodyum kanalı tonik duyu alıcıları ve kalp pili depolarize potansiyellerde en duyarlı konumdadır ve bu durum da sinir sisteminin çok az spontan aktivite gösterdiğini veya hiç göstermediğinden dolayı böceklerin felçli görünümde kaldığı belirlenmiştir. Fazik duyu reseptörlerinin uyarılması ile aktivasyon başlamaktadır. Bu kasılma durumu birkaç saniye içerisinde birden fazla sodyum kanalı tıkanıkça sona ermekte; dolayısıyla böceklerde yalancı felç durumu tekrar oluşmaktadır (Salgado, 1990). Bu titremelerden sonra fazik nöronlar ve aksonlardaki sodyum kanallarının blokajdan kurtulduğu bir refrakter dönem bulunmaktadır. Pirazolinler, lokal anestezik bölgede bağlanarak sodyum kanallarını bloke etmektedir (Salgado ve Hayashi., 2007, Payne vd., 1998). Bununla beraber, diğer ilaçların aksine pirazolinler girişi ve çıkışı çok yavaş bir konumdadır bu olayda açık sodyum kanallarının doğrudan bloke edilmesini

engellediği belirlenmiştir. Pirazolinler sodyum kanallarıyla çok yavaş etkileşim içerisine girerler ve reseptöre esas olarak lipid çift tabakasından lateral difüzyon yoluyla erişim sağlarlar ve hücre zarının her iki yüzeyinden eşit derecede sodyum kanallarını bloke ederler (Salgado ve Hayashi., 2007). Sodyum kanalı bloke edici (SCBI) 'lerin oksadiazin alt sınıfının bir yesi olan Indoxacarb, ilk ticarileştirilmiş SCBI organofosfatlı insektisit sınıfında yer almaktadır (Silver vd., 2010); MTF'de, hayvan sağlığı pazarındaki ilk SCBI'dır.

Nöroaktif insektisitlerin geliştirilip ürün yelpazesine eklenmesiyle böceklerin sinir sistemi üzerindeki etkileri arasında organik fosforlu ve metilkarbamatlar için asetilkolinesteraz, neonikotinoidler için nikotinik asetilkolin reseptörleri, poliklorosikloheksanlar ve fiproller için gama-aminobutirik asit reseptör kanalı ve piretroidler, diklorokindatlar, diklorokindatlar için voltaj kapılı sodyum kanalları bulunmaktadır (Buszewski vd.,2019).

DuPont'ta dihidropirazollerin ticari tescile ulaşan ilk SCBI insektisit olan indoxacarb dahil olmak üzere toksikolojik sınırlamaların üstesinden gelme çabaları bir dizi insektisit ilacında geliştirilmesine yol açmıştır. Indoxacarb, böceklerde insektisit yapısında bir metabolit olan N-dekarbometoksile indoksakarba (DCJW) zerinde etkili ve biyoaktivasyona uğrayan proinsektisit olarak kabul edilmektedir. Ayrıca Indoxacarb memelilerde biyoaktif edilmekte ancak DCJW'ye göre N-dekarbometoksilasyon bceklerdekinden daha az etki gösterebilmekte ve detoksifikasyon işlemi alternatif biyokimyasal yollarla sağlanmaktadır. Böceklerde indoxacarb'ın DCJW'ye dönüşümü, daha az toksisiteye sahip olmasından ve böylece dihidropirazollerin temel eksikliklerinin üstesinden gelmesinden dolayıdır (von Stein ve ark.,2013).

Nihon Noyaku Company'deki araştırma, çekirdek halka yapısının modifikasyonu ile dihidropirazollerin çevresel ve toksikolojik profilinin iyileştirme çalışmaları sonucunda dihidropirazollerin halka açılmış analogları olarak düşünülen bir dizi semikarbazon yapıda insektisit bulunmuştur ve SCBI insektisit olan MTF'nin keşfedilmesine yol açmıştır. MTF geniş bir insektisidal aktivite spektrumuna ve memeliler için düşük akut ve kronik toksisiteye sahip olduğuna ilişkin çalışmalar bulunmakta ise de henüz MTF toksisitesi hakkında literatürde yeterli çalışmaya rastlanılmaması bu maddenin zararlı etkilerine yönelik eksik bölümlerini oluşturmaktadır (von Stein ve ark.,2013).

Veteriner hekimlikte pire ve kene tedavisinde kullanılan ticari olarak üretime sunulmuş Promeris adı altında kullanılmakta olan bu böcek ilacının içeriği MTF ve amitrazın karışımından oluşmaktadır. MTF, Philips-Duphar tarafından 1970'lerin başında sodyum bloke edici insektisitlerden (SCBI) birisi olarak keşfedilen pirazolin grubuna yapısal olarak benzerlik göstermektedir (von Stein vd.,2013). Yapısında bulunan pirazolinler sayesinde böceklerin sinir sistemine etki ederek felç meydana getirmektedir (Salgado ve Hayashi,2007). Tarımda da domates güvesi, yeşil kurt, pamuk yaprak kurdu, patates böceği gibi zararlılarla mücadele de yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.5. Metaflumizon Etki Mekanizmaları

Semikarbazon grubuna ait yeni bir insektisit sınıfında yer alan MTF ağız yolu ile maruziyet neticesinde böcekler de sinir sistemi hücrelerinde sodyum kanalı reseptörlerine bağlanarak kanalları tıkayan ve sonucunda da ölüm meydana getiren bir kimyasal madde olarak bilinmektedir. MTF voltaja bağımlı bir sodyum kanalı bloke edici insektisit olup; indoxacarb ile benzer kimyasal bir yapıya sahiptir. (Salgado ve Hayashi., 2007).

1.6. Serbest Radikal

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya bileşikler bu elektronlarını paylaşabilmek için son derece aktif olup diğer moleküllerle hızla reaksiyona girebilirler. Reaktif ve kısa ömürlü olan serbest radikaller hücrede enerji üretimi için solunum başta olmak üzere birçok reaksiyon tarafından üretilen moleküllerdir. Atmosferde serbest halde yaygın olarak hidroksil radikali, süperoksit anyon, demir ve bakır gibi geçiş metalleri, nitrik oksit ve peroksinitrit gibi çok sayıda radikal yaygın olarak mevcuttur. Aralarında ki en güçlü oksidan olan hidroksil radikali kısa bir yarı ömre sahip olup çoğu biyolojik moleküle hasar vermek amacıyla reaksiyona girmektedir. Serbest radikaller canlılar da birçok farklı sebepten dolayı oluşabilmektedir. Üretilen bu serbest radikaller başta membran lipidleri olmak üzere hücre içi proteinlere veya kalıtsal materyalin yapıtaşı olan nükleik asitlere bağlanarak yapı ve fonksiyon değişikliğine sebep olup hücre hasar meydana getirmektedirler (Hu vd.,2019).

Serbest radikallerin kaynakları endojen ve eksojen olarak sınıflandırılmaktadır. Endojen kaynaklar başlıca yangı durumunda sitokinlerin serbest kalması sonucunda nötrofiller ve makrofajlar serbest radikallerin üretimini başlatmaktadır. Benzer olarak mitokondri de aerobik solunum esnasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler tarafından yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. UV ışınları, X ray, gamma ışınları başta olmak üzere insektisitler, kloroform gibi su kirlletici ajanlar, alkol ve sigara kullanımı da serbest radikal üretimini destekleyen eksojen kaynaklar olarak sınıflandırılmaktadır (Altınar vd., 2018; Jakubczyk vd.,2020; Yaribeygi vd.,2019).

Yaşam için temel element olan oksijen birçok organik molekülün (hidrojen, kükürt, karbon, nitrojen) yapıtaşını oluşturmaktadır. Metabolik reaksiyonlar da oksijenin %90'ı mitokondri de oksidatif fosforilasyon sırasında kullanılmaktadır. Mitokondri

de kullanılan oksijenin %1-3'ü ROS'a dönüştürülmektedir (Muller vd.,2004).

Oluşan ROS çeşitleri arasında süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali olmak üzere 3 grup altında incelenmektedir. ROS türleri son derece aktif moleküller oldukları için hücrenin temel yapıtaşları olan lipid, protein ve karbonhidrat yapılarında işlev bozukluğuna neden olurlar. Bu yüzden hücresel yapılara verilen hasarı engellemek amacıyla antioksidan sistemler veya antioksidan olarak adlandırılan savunma sistemi mevcuttur. Bu antioksidanları endojen (antioksidan enzimler) ve eksojen (vitaminler) olmak üzere iki grup altında sınıflandırmak mümkündür. Antioksidanların başlıca görevi ROS'u ortamdan uzaklaştırmak veya daha zayıf moleküllere dönüştürmekten ibarettir (Li vd.,2021).

Oksidanlar ve antioksidanlar vücutta denge halinde bulunmaktadır. Fakat bazı endojen ve eksojen kaynaklar sebebiyle ROS artışı bu dengeyi oksidanların lehine oluşturmaya başlar (Flora., 2007). Antioksidanların artan oksidanlara karşı yetersiz kaldığı bu durumda ise oksidatif stres diye adlandırdığımız durum oluşmaktadır.

Dengesizlik sonucunda oluşan oksidatif stres hücresel metabolizma sırasında ortaya çıkan ROS ile oluşan ve tüm aerobik hücrelerde görülen bir patolojiden ibarettir. Artan ROS miktarı ile birlikte antioksidan savunma sisteminin detoksifikasyonunda azalmalar sonucunda serbest radikallerin birikimi hücre membranında bulunan lipid yapılarında oksidatif hasar meydana getirmektedir.

1.7. Oksidatif Stres

Oksidatif stres terimi reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizliği ifade etmektedir (Halliwell., 2007). Oksidatif stres biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturduğu bilinmektedir. Oluşan bu

ROS'u temizlemek için antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizma da birçok yan etki meydana gelebilmektedir. Reaktif oksijen türleri normal biyolojik süreçler açısından çok önemli olmakla birlikte, potansiyel olarak tehlike oluşturmaktadır ve yaygın bir şekilde prooksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif stres diğer bir tanımlamayla organizmadaki redoks eşleşmesindeki dengesizlik olarak da ifade edilebilmektedir. Bu dengesizliğin sebebi çok faktörlü olarak karşımıza çıkmaktadır. ROS organizma için faydalı olarak bilinse de, aşırı üretim ve atılımının dengeli olmaması halinde birçok sorunu da beraberinde getirmektedir (DSouza., 2017).

ROS, hücrel metabolik aktiviteler, hava kirleticileri ya da sigara dumanı gibi çevresel faktörler tarafından üretilmekte ve yapılarındaki eşleşmemiş elektronlar nedeniyle oldukça reaktif moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücredeki karbonhidratlar, nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi çeşitli biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girerek işlevlerini değiştirmektedir. ROS oluşumunun ana kaynağı mitokondriyal solunum zincirinden elektronların sızması ve daha sonra süperoksit anyonu (O_2^-) oluşumuyla sonuçlanan moleküler oksijene aktarılmasıdır. ROS kendisi, Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) enzim oksidaz aktivasyonu ile üretilen nitrik oksidin (NO) fizyolojik üretimi O_2^- üretimini kuvvetlendirmekte, endotelial disfonksiyon durumunda da NO üreten peroksinitrit enzimini oksitleyerek NO üretimini nötralize etmektedir. Bu yüzden proteinlerin, karbonhidratların ve lipidlerin oksidasyonunun artmasına yol açan ROS üretimini başlatmaktadır. Metabolizmanın ardından, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, özellikle 4-hidroksi-nonenal (HNE), 4-oksi-2-nonenal (ONE) ve malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyonunun çeşitli son ürünlerinin üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. (Rehman ve Akash., 2017).

ROS ayrıca redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin yukarı regülasyonu ve histon asetilasyonunda değişim meydana getirerek kromatinlerin yeniden şekillenmesi yoluyla birkaç genin ekspresyonunu etkilemektedir. Redoks durumunun

düzenlenmesi, hücre canlılığı, aktivasyonu, çoğalması ve organ fonksiyonu için kritik bir öneme sahiptir.

Reaktif oksijen ara maddeleri (süperoksit ve hidroksil radikalleri ile hidrojen peroksit dahil), lipid ve protein peroksidasyonu ve nükleik asit hasarını da dahil ederek doğrudan hücresel hasara sebep olabilir (Manda vd.,2009). Oksidatif stres, antioksidanların tükenmesi veya ROS birikimi nedeniyle antioksidanlar ve ROS arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres meydana geldiğinde hücreler, savunma enzimlerini, transkripsiyon faktörlerini ve yapısal proteinleri kodlayan genlerin aktivasyonu veya susturulması yoluyla oksidan etkilere karşı koymaya ve redoks dengesini yeniden sağlamaya çalışmaktadır (Dalton vd., 1996). Oksitlenmiş ve indirgenmiş glutatyon (2GSH/GSSG) arasındaki oran, vücuttaki oksidatif stresin önemli belirteçlerden bir tanesidir. Vücutta daha yüksek ROS üretimi, DNA yapısını değiştirebilmektedir. Proteinlerin ve lipidlerin modifikasyonu ile de stres kaynaklı birkaç transkripsiyon faktörünün aktivasyonu aracılığıyla proinflamatuvar ve antinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırma ile sonuçlanmaktadır. Bununla beraber, oksidatif stres, aynı zamanda esas olarak nekroz, apoptoz ve iltihaplanma mekanizmalarıyla ortaya çıkabilen doku hasarının ve hatta hücre ölümünün ana sebeplerindendir. Bunlara ek olarak yaşlanmayı hızlandırır ve çeşitli dejeneratif durumlara sebep olmaktadır (Sies vd., 2020; Pisoschi vd.,2021; Forman ve Zhang.,2021).

UV ışınları, kimyasal maddeler ve tarımda sıklıkla kullanılan pestisitler farklı mekanizmalar yoluyla oksidatif strese neden olabilmektedir. Bununla birlikte, indüklenen oksidatif stres, modifiye proteinler, lipidler, DNA, yüksek veya düşük moleküler kütleli antioksidanlar dahil olmak üzere hücresel bileşenin ROS ile indüklenen modifikasyonları yoluyla izlenebilmektedir (Lushchak vd.,2018). Aşırı miktarda hidroksil radikali ve peroksinitrit, lipid peroksidasyonuna neden olabilir ve böylece hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar verebilmekte ve bu hasar sonucunda kan ve dokularda malondialdehit (MDA) ve konjuge dien bileşiği oluşumuna yol

açmaktadır. Radikal bir zincir reaksiyonu olan lipid peroksidasyonu, büyük miktarda lipid moleküllerini etkileyerek çok hızlı bir şekilde yayılım gösterir. LPO, serbest ara radikaller oluşturmak ve yarı kararlı peroksitler üretmek için lipidlerin ve oksijenin doğrudan reaksiyonunu kapsamına almaktadır. Histopatolojik inceleme açısından serbest radikal mekanizması, toksisite indüksiyonunun önemli bir faktörü olan fosfolipidlerin bozulması ve hücre zarının bütünlüğünün kaybı ile dokularda dejenerasyon ve nekroz olgularının oluşumuna sebep olmaktadır (Pizzino vd., 2017).

1.8.Apopitoz ve Nekroz Tanımı

Hücreler iki farklı yöntem ile ölüme sürüklenirler. Bu yöntemler nekroz ve apoptozis olarak bilinmektedir. Nekroz olgusu; O₂ yetersizliği, farklı ısı değişiklikleri, zehirlenmeler gibi hücre içinden olmayan faktörlere maruz kalınabilecek farklı fiziksel ve kimyasal sebepler sonucunda oluşabilen travmatik olgulara bağlı olarak şekillenen hücre ölümleridir. Apoptozis, metabolizmanın gereksinim duymadığı, biyolojik işlevini tamamlamış veya hasara uğramış hücrelerde zararsız bir biçimde hücrelerin yok edilmesini sağlayan ve genetik olarakta yok edilmesini sağlayan programlı bir hücre ölümüdür. Nekroz olgusu ise patolojik bir tanım olarak kabul edilir. Apoptozis de bu durum ise fizyolojik ya da patolojik dış kaynak uyarılarıyla şekillenebilir (Thompson., 1999). Apopitozis gerçek anlamda Latince kullanım olarak ağaçların yapraklarının dökülmesini tanımlayan bir terimdir. Apo, farklı; ptozis, düşen anlamında kabul edilmektedir. Sonraki yıllarda yapılmış olan çalışmalar ışığında bugün ki adıyla apoptozis olarak bilinen tanımlama farklı yönlerdeki fizyolojik ve biyolojik olayların önemli bir fonksiyonunu oluşturan süreç olarak kabul edilmektedir.

Metabolizma için zararlı olan hücrelerin yok edilmesi, embriyo gelişim aşamasında farklılaşma, savunma sisteminin gelişim aşaması, yangısal sürecin çözüme ulaştırılması, organ ve sistemlerde hücrelerin kontrolü, fonksiyonunu yitirmiş ve hasarlı hücrelerin yok edilmesi, organizmanın homeostazisinin devamlılığında ve

farklı birçok durumda apoptozis olgusu önem kazanmaktadır. Bu işlevlerin bozulması organların çalışmasında yavaşlama ve tümör oluşumlarına sebep olabilmektedir (Özoran., 1992). Nekroz ve apoptozis tanımlamaları, yöntem olarak hücre ölüm şekilleri olarak bilinmesine rağmen her iki ölüm türünün hem histopatolojik hem de fizyolojik sebeplerinde farklılıkları görülmektedir. Nekrozun özgün bir özelliği ölümün hücre gruplarında oluşmasıdır. Nekrozun en yaygın görülen sebebi oksijen yetersizliğidir. Aynı şekilde arsenik, kadmiyum gibi ağır metaller, insektisitler ve siyanid gibi toksik ürünler de nekroz oluşturmaktadır (Özoran., 1992). Nekroza sebep olan olaylar zinciri hücreler ile onların ve organel yapılarının parçalanmasına yol açan hücre geçirgenliğinin artışı ve bunun devamında da sitoplazma ile çekirdek bütünlüğünün hücreler arasındaki boşluk bölümüne salgılanmasında rol üstlenmektedir (Özoran., 1992). Hücre ölümü oluştuktan sonra hücrelerin temel faktörlerinin hücreler arası boşluğa salgılanması yangıya neden olabilmektedir. Bu olayın temel özelliği makrofaj ve nötrofil diye adlandırdığımız yangı hücrelerinin nekroz olmuş dokuya göç etmesinden oluşmaktadır. Göçün olduğu bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite etmekte ve bu olay da yangının nekroz olgusunda önemli bir işareti olarak kabul edilmektedir. Apoptozis olgusunda ise nekrozdan bütünüyle farklı olarak yangı oluşmaksızın gerçekleşen, genetik olarak düzenlenen, programlı, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan, metabolizma da denge kuran bir olgu olarak kabul edilmektedir (Öztürk., 2002).

Hastalıklar gereğinden fazla apoptozis sonucunda görülebilmektedir. Apoptozisin fazla oluşması nörodejeneratif değişikliklere, AIDS'te görülen lenfosit kaybına, azalması gibi durumlar ise kötü huylu tümör ve otoimmün hasarlara neden olmaktadır (Guerrero ve Arias., 2001). Embriyolojik ve fetal gelişim aşamalarında normal gelişimini tamamlamış hücrelerin bir kısmı direkt olarak apoptosize yönelmektedir. Derideki keratin hücrelerinin üst kısma doğru transfer olup epidermisin en üst tabakası olan stratum korneum tabakasını şekillendirmeleri, tümör olgularında regresyon faz aşamasında hücre ölümü, akut yangısal durumlarda nötrofillerin ölmesi, viral hastalıklarda hücre hasarı, toksik zehirlenmelerde hücre ölümü ile hücrelerdeki sayısal artışa uğrayan olgularda (örn: bağırsak kript epiteli) apoptozis ile sık karşılaşılır. Apoptozisin Alzheimer, Parkinson, amiyotrofik iskemik hasarda,

reperfüzyon hasarında, hepatit ve otoimmün hastalıklarda sık gözlemlendiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. (Guerrero ve Arias., 2001).

1.8.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptozis diye adlandırdığımız durum hücre içerisinden ya da dışarısından gelen sinyallerle başlatılan ve bunu takip eden bir olaylar bütünüdür. Sonunda da hücrenin fagositozu ile biter. Bu aşamaları şu şekilde sırayabiliriz Apoptozis olgusunun başlatılması, Hücre içi proteazların (kaspazların) aktive olması, Hücrede farklı fiziksel, biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerin şekillenmesi ile son aşama da fagositoza yönelme olarak özetlenebilir (Thompson., 1999). Hücrede apoptozisin oluşabilmesi için başlangıçta genetik mekanizmayı aktive ederek bir sinyal ile karşılaşması gerekmektedir. Bu sinyaller hücre içinden ya da dışından kaynağını alabilir (Thompson., 1999).

1.8.1.1. Hücre dışından kaynaklanan, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ile (Tümör nekrozis faktör süperailisi üyeleri ve bunların reseptörleri) düzenlenen apoptozis

Hücre yüzeyindeki reseptör molekülleri, farklı alıcıları aktive ederek hücre fonksiyonlarında değişiklikler oluşturabilirler (Franco vd., 2009). Hücre yüzey reseptörleri hücre ölümünü de yol açabilir. Apoptozis olgusunda membran reseptörlerine bağlı olan önemli bir grup tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) olarak adlandırılan ailedir. Bu reseptörlerin en az 19 üyesi bulunmaktadır. Reseptörlerin biyolojik fonksiyonları farklı farklı olup bir kısmı apoptozise yönlendirirken bir kısmı proliferasyona sebep olmaktadır. Her ikisinin görüldüğü olgularda mevcuttur (Thompson., 1999). TNFR içerisinde apoptozise yol açan reseptörlerden en önemlileri de Fas ve TNFR1'dir. Bunlara uyarı geldikten sonra

hücrelerin sitoplazmasında ki bölümleri adaptör proteinlere bağlanmaya çalışır.

Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı devreye sokar ve hücre dışarısından gelen uyarıyı hücre içerisine iletir. Bu yolağın öncüsü Fas proteindir. Fas sadece Fas ligandı (FasL) olarak adlandırılan bir hücre dışı sinyaller tarafından başlangıcını alır. FasL, Fas'a bağlantı yaptığı anda kaspaz 8'i aktivasyonunu başlatır ve tüm kaspaz zinciri olguya dahil olur (Guerrero., 1998).

1.8.1.2. Hücre içinden kaynaklanan, mitokondriyal yolla düzenlenen apoptoz:

Hücre içerisindeki sinyallerle şekillenen apoptozis olgusunda mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Sinyal yolları dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına sebep olmaktadır. Bu zarın geçirgenliğine de bazı proteinler aracılık etmektedir. Bunlardan başta sayılabilecek olan Bcl-2 grubu proteinlerdir. Bu grup da yer alan proteinlerin bir kısmı antiapoptotik, bir kısmı ise proapoptotik olarak sınıflandırılır (Gastman ., 2001). Bcl-2 proteini antiapoptotik olarak bilinir. Mitokondri dış membranına ve apoptozis proteaz aktive edici faktör 1'e (apaf 1) tutunarak işlev görür. Hücrenin içinden köken alan apoptotik yollar apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına sebep olur. Bu ayrılma sonucunda dış mitokondri zarının geçirgenliğinde artış şekillenir. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole ayrılmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımı ile de hücrede apoptozis başlar. Sitokrom c sitoplazma da apaf 1, kaspaz 9 ve adenosin trifosfat (ATP) ile birleşmeye eğilimlidir. Oluşan bu yapıya da apoptozom adı verilmektedir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz diye adlandırılan kaspaz 3' ü reaksiyonunu başlatarak apoptozisin oluşmasına sebep olur (Gastman., 2001).Apoptozis oluşmasında bir diğer yolak da viral enfeksiyonlara karşı esas savunma mekanizmaları olarak bilinen sitotoksik T hücrelerinin (CTL) viral yolla enfekte olmuş hücrelerde apoptozise yönelmesidir (Mountz ve Zhou., 2001). Bunlar yabancı antijenleri algıladıklarında yüzey bölgelerinde FasL oluşmakta ve böylece hedef hücreler de Fas reseptörlerine tutunmaktadırlar. CTL'ler sitoplazmal bölgelerinde granzyme B (serin proteaz) ve perforin diye adlandırılan ve sonuçta da apoptozis

oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptir. Perforin, transmembran por oluşturunca bir protein olarak bilinir. CTL'ler hedef hücrelerin yüzey bölgelerinde perforin ile gözenekler oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgılanmasına neden olurlar. Granzyme B hedef hücrelere dahil olarak kaspazları aktivasyonunu oluşturur (Mountz ve Zhou., 2001). Hücrelerde iç veya dış uyaranlarla DNA hasarı şekillendiği zaman aktive olan bazı gen bölgeleri, hücrenin apoptozisine sebep olmaktadır. Bu genlerden en önem olarak bilinenide p53 genidir.p53 geni apoptozise neden olan gen olarak da bilinmektedir. Normalde inaktif konumda bulunan p53 geni, DNA hasarı şekillendiği zaman aktive olarak p21 genini harekete geçmesini sağlamaktadır. p21 geni ise hücrenin geç G1 fazında durarak, S fazına geçmesinin önüne geçer. Bundan dolayıda hücre siklusu kesintiye uğrayarak şekillenmiş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA onarımı yapan proteinlerin transkripsiyona neden olur Bu proteinler DNA hasarı ortadan kaldırılırsa, hücre siklusundaki kesinti de yok edilmiş olur. Hücre hasarının tamiri istenilen oran da şekillenmezse bu sefer p53 geni bax proteininin (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktivasyonunu sağlayarak mitokondrinin de olaya eşlik etmesiyle hücrenin apoptozise yönelerek ölmesine neden olur. Bu şekilde de DNA hasarlı hücre yok edilir (Mountz ve Zhou., 2001; Ferri., 2001).

1.8.2. Apoptoz Saptama Yöntemleri

Apoptoz hücre temel fonksiyonunu esas alarak veya fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak hücreler de DNA kırılımlarının belirlenmesi yoluyla saptanabilmektedir. Hücre morfolojisi temel alınarak floresans maddelerin (Hoechst boyası, DAPI, propidium, iyodür) kullanılması ile yapılan boya maddeleriyle floresans mikroskobu ile inceleme yapıldığında, kültür ortamında üretilen hücreleri incelemek için faz kontrast mikroskobu da kullanılabilmektedir. Faz kontrast mikroskobu aracılığı ile apoptotik hücreler üzerinde oluşan farklılıklar belirlenebilir. Hücreler ortama yeni yayılmış bir durumda iseler hücrelerin sitoplazmalarında ortaya çıkan vakuoller de seçilebilir. Işık mikroskobu aracılığıyla detaylı bir inceleme yapıldığında apoptotik hücrelerin kendine has özellikleri özellikleri küçülmüş bir

sitoplazma ile çekirdeğe ait değişimlerden oluşmaktadır. Kromatinin çekirdek zarının çevresinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi ve birçok parçaya bölünmesi ile şekillenen morfolojik değişikliklerden oluşmaktadır (Schneider ve Tschoop., 2000). Apoptozisin hücrenin çekirdeği ve organelleri düzeyindeki farklılıkları elektron mikroskobu ile belirleyebilmekteyiz.

1.8.2.1. TUNEL metodu ile DNA fragmentasyonunun belirlenmesi

Tek ya da çift sarmallı DNA kırıklarına işaretlenmiş nükleotidlerin bağlanması temeline dayanmaktadır. Apoptotik oluşmuş hücrelere ait DNA'lar hızlıca parçalara ayrıldıklarından aniden hücre içerisindeki kromatinlerin bütünlüğü yok olur ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısında artış görülür. Hücrede Tdt (terminal deoxynucleotidyl transferase) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA bölümlerinin serbest 3'-OH uçlarına bağlanmaktadır. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları, ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin ilave edildiğinde görünür hale gelir (Hilton vd., 1997).

1.8.2.2. In situ hibridizasyon tekniği

Apoptozisin belirlenmesi amacıyla işaretlenmiş poly (A) problemlerinin kullanılması aracılığı ile yapılan bir yöntemdir. Apoptotik DNA'ya sahip hücrelerin denaturasyona duyarlılığının formalin aracılığı ile tespitinin yapılarak parafine gömülmüş dokularda çalışılması esasına dayanmaktadır (Hilton vd., 1997).

1.8.2.3. Anneksin V yöntemi

Hücre membranının sitoplazmik yüzünde fosfotidilserin bulunmaktadır. Hücreler apoptozise yönelirse iç yüzünde yerleşim gösteren fosfotidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne doğru transfer olur. Bu fosfotidilserinler bir floresans madde (örn: FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür karakter haline getirilmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem flow sitometri aracılığıyla yapılmakta ve floresans mikroskobu ile de incelenebilmektedir (Hilton vd., 1997).

1.8.2.4. Apoptoza özgü proteinlerin saptanması

Western blotting veya immünohistokimyasal yöntemlerin kullanılması aracılığıyla kaspazlar gibi sadece apoptotik hücrelerde aktif görünüme sahip olan ya da eksprese olan (örn: Bcl-2 vb.) bazı proteinlerin dokularda belirlenmesi temeline dayanan bir yöntemdir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araç ve Gereçler

Cam malzemeler [Erlenmayer (50-100 ml), beher (25-50-100 ml), mezür,tüp]

Cerrahi malzemeler (pens, makas)

Distile su cihazı (GFL, 2202)

Buzdolabı (Beko, D 8459 SM)

Derin dondurucu (Uğur, UDD300BK)

Santrifüj (Neofuge 13R-Refrigerated Centrifuge-Heal Force Bio) Vorteks (IKA, MS2)

Hassas terazi (Precisa 205 ASCS)

Su banyosu (Nüve. BM 402)

Isıtcılı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica)

Dijital pH metre (Inolab, WTW)

Değişik hacimlerde otomatik pipet (Socorex-Acura 825; 10–100 µl; 100– 1000 µl)

Sarı ve mor kapaklı kan tüpleri (Isolab)

Ependorf tüpü (1,5 mL'lik, Roth)

Cerrahi eldiven (Dolphin)

Polietilen enjektör (5 mL, Ayset)

Spekrofotometre (Shimadzu 1601 Uv-Visible)

Mikrotom (Leica, RM 2245)

Su banyosu (Leica, HI 1210)

Etüvde (Thermo, Heratherm)

Işık mikroskobu (Nikon, Eclipse Ci, Tokyo, Japan)

Kamera (Nikon DS Fİ3, microscopic digital camera systems, Tokyo, Japan)

2.1.2. Hayvan Materyali

6-8 haftalık 200/250 g ağırlığındaki sağlıklı Sprague-Dawley cinsi 32 erkek rat Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (Afyonkarahisar/Türkiye)'nden temin edildi. Hayvanlar oda sıcaklığında (25°C) bağıl nemde (%50-55) standart rodent yemi ve suyla, 12 saat karanlık/aydınlık periyotlar aralığında tutuldu. Standart rodent yemi ve içme suyu ratlara ad libitum olarak verildi. Deney uygulamasına başlamadan ratlar en az 7 gün boyunca ortama uyum sağlamaları açısından bekletildi. Yapılan bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Etik Kurul'undan 49533702/189 sayılı onay alınarak başlandı (EK-1).

2.2. Metot

2.2.1. Deneysel Aşama

2.2.1.1. Deneysel Aşamanın Planlanması ve Uygulanması

Sunulan çalışmada Metaflumizon olarak Alverde® (BASF, Tuerk Kimya San. ve Tic. Ltd. Sti, İstanbul, Türkiye) kullanılacaktır. Çalışmada toplam 32 erkek rat, her grupta 8'erli hayvan olacak şekilde rastgele örnekleme yöntemiyle 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna fizyolojik su verildi. Metaflumizon gruplarına ise daha önceki yapılan çalışmalar örnek alınarak (World Health Organization,2009) MTF'nun LD₅₀ dozu olan 5000 mg/kg'nın 1/25'i (200 mg/kg), 1/50'si (100 mg/kg), ve 1/100'ü (50 mg/kg) intragastrik gavaj yoluyla oral olarak 28 gün boyunca uygulandı. Bu dozlar

28 gün boyunca günde tek doz halinde toplam hacim 1 ml miktarda olacak şekilde yapıldı.

Grup I- Kontrol grubu- deiyonize su verildi.

Grup II-MTF₅₀ grubu- Metaflumizon 50 mg/kg,oral

Grup III- MTF₁₀₀ grubu- Metaflumizon 100 mg/kg,oral

Grup IV- MTF₂₀₀ grubu- Metaflumizon 200 mg/kg, oral

2.2.1.2. Deneysel Aşamanın Sonlandırılması

Ratlar deney aşaması olan 28 günlük sürenin tamamlanmasından sonra sakrifiye edilmeden önce 87 mg/kg i.m. ksilazin uygulamasıyla preanesteziye alındı, daha sonra 13 mg/kg dozunda i.m. ketamin uygulanarak tam anestezi uygulandı. Biyokimyasal ve histopatolojik analizler de kullanılacak olan dokular için hayvanlar servikal diskolasyon ile öldürülerek karaciğer, böbrek ve beyin dokuları çıkarıldı %0.9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra boş tüplere alındı.

2.2.2. İntrakardiyak Kan Alımı, Sakrifikasyon Ve Alınan Örneklerin Saklanması

Anestezi sonrasında göğüs kafesi açılarak intrakardiyak olarak etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) enjektörle 3-5 cc kan alındı. Bunun hemen sonrasında servikal dislokasyon yapılarak sakrifikasyon işlemi yapıldı. Alınan kanların 3000 devirde (10 dakika) santrifüj yapılarak plazmaları ayrıldı ve analizleri yapılmıncaya kadar -80 °C de saklandı. Toplanan kan örnekleri 30 dk içinde 4°C'de 15 dk 600 g'de santrifüj edilmesi sonrasında plazma ve serum örnekleri elde edildi. Diğer analizler için kullanacak olan plazma ve serum örnekleri boş tüplere alındı. Ratların sakrifiye edilmesinden sonra açılmış göğüs kafesi yanında batın bölgesi

cerrahi yöntemlerle açılarak karaciğer, böbrek ve beyin dokuları örnek tüplerine alındı. Dokuların birer parçası biyokimyasal incelemeler için -80°C de saklanırken diğer kısımları histopatolojik takibe alınmak üzere %10 formaldehitli tüplere alındı. Belirtilen doku örnekleri alındıktan sonra kalan hayvansal atıklar, tıbbi atık ünitesi tarafından temin edilen özel ambalajlara konularak usulüne uygun yok edilmesi için tıbbi atık ünitesine teslim edildi.

2.2.3. Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Parametreler

2.2.3.1. Doku Homojenizasyonu

0.5 g doku üzerine 5 ml olacak şekilde hazırlanan soğuk KH_2PO_4 (50mM; PH=7) ilave edildi. Hem mekanik ve hem de 20k Hz ultrasonik homojenizatör ile homojenizasyon yapıldıktan sonra 5000 devirde 15 dk sentrifuj edildi. Elde edilen süpernatant biyokimyasal analizlerde (MDA, GSH, SOD ve CAT tayininde) kullanılmak üzere ependorflara aktarıldı. Analizler yapılncaya kadar -80°C’de saklandı.

2.2.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Plazmaları ayrılan kan örnekleri üzerine eşit miktarda KH_2PO_4 tampon solüsyonu ilave edildi ve 3 defa 3000 devirde (5 dk) santrifuj edildi. Örnekler izotonik solüsyonda 3. kere yıkandıktan sonra beyaz kısımları atıldı. En son aynı miktarda eritrosit ve izotonik solüsyondan ependorflara alındı ve analizler yapılana kadar -80°C’de buzdolabında muhafaza edildi. Hemolizat için eritrosit paketinden 0,8 ml alındı ve üzerine soğuk distile su eklenerek hemolizat eldesi sağlanmış olunur. Elde edilen bu hemolizatlar süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivite tayininde kullanıldı (Winterbourn vd., 1975).

2.2.4. Tam Kan ve Doku Homojenatlarında Malondialdehid (MDA) Ölçümü

Lipid peroksidasyon(LPO) son ürünü olan malondialdehid (MDA), tam kanda Draper ve Hardley (1990) , doku homojenatlarında ise Ohkawa ve ark. (1979)'nin metoduyla belirlendi. Metotların prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu sonucu ortaya çıkan rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır ve bu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçüldü. MDA konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısıyla hesaplanır ve kanda nmol/mol veya dokuda nmol/g olarak ifade edildi.

Tam kan da MDA ölçerken kullanılan çözeltiler:

%10'luk Trikloroasetik asit (TCA): 10 g TCA 100 ml dH₂O de çözdürülecektir.

%0.8'lik TBA: 1 g NaOH 500 ml dH₂O'da çözdürüldü ve 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözdürüldü.

Dokularda MDA tayininde kullanılan çözeltiler:

50 mM KH₂PO₄: 3.4 g KH₂PO₄ 500 ml dH₂O ile tamamlandı.

% 8.1'lik SDS çözeltisi: 2.02 g SDS 250 ml dH₂O'da çözdürüldü.

% 20'lik Glasiyel asetik asit: 20 ml glasiyel asetik asit 100 ml dH₂O ile hazırlandı.

% 0.8'lik TBA: 1 g NaOH 500 ml dH₂O'da çözdürüldü ve 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözdürüldü.

N-butanol pirin karışımı: 750 ml n-butanol 50 ml piridinle karıştırılacaktır.

2.2.5. Tam Kan ve Doku Homojenatlarında Glutasyon (GSH) Ölçümü

GSH konsantrasyonu tam kan ve doku homojenatlarında Beutler ve ark. (1963) tarafından tanımlanan metot kullanılarak ölçüldü. Kısaca, 0.2 ml örnek 1.8 ml distile su eklendi. 3 ml presipitasyon solüsyonu (1.67 g metafosforik asit, 0.2 g EDTA ve 30 g NaCl 100 ml distile suda çözündürüldü) numune ile karıştırıldı. Karışım yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra filtre edildi (Whatman No.42). Filtrattan 2 ml alındı ve daha sonra başka bir tüpe alınıp 8 ml fosfat solüsyonu (0.3 M disodyum hidrojen fosfat) ve 1 ml 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) eklendi. Kör için 2 ml dilüe presipitasyon solüsyonu, 8 ml fosfat solüsyonu ve 1 ml DTNB reaktifi solüsyonu eklendi. GSH standart standart solüsyonu (40 mg/100 ml) hazırlandı. Optik dansite spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar kanda nmol/ml veya dokuda nmol/g olarak ifade edildi.

Kullanılan Çözeltiler:

Çöktürücü: 5 g metafosforik asit+ 1 g EDTA+90 g NaCl 300 ml dH₂O'da çözündürülecektir.

Fosfat çözeltisinde 0.3 M Na₂HPO₄: 40.02 g Na₂HPO₄.7H₂O 500 ml dH₂O'da çözündürülecektir.

DTNB; 40 mg DTNB 100 ml %1'lik Na sitrat çözeltisiyle çözündürülecektir.

GSH standardı: 10 mg GSH, 25 ml dH₂O' da çözündürülecektir.

2.2.6. Eritrosit Lizatında ve Doku Homojenatında superoksit dismutaz (SOD)Aktivitesinin Ölçümü

Eritrosit lizatında ve doku homojenatında SOD'un antioksidan enzim aktivitesi Sun ve ark. (1988)'nin metoduna göre ölçüldü. Süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolyumu (NBT) mavi renkli formazona indirgemesiyle elde edilen

absorbans, spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda belirlendi. SOD aktivitesi eritrosit için U/mgHb veya dokudaki protein için U/ μ g olarak ifade edildi.

Kullanılan Çözeltiler:

Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PSB): 8.06 g NaCl, 0.201 g KCl, 12.636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 1 L dH_2O 'da çözündürüldü ve pH'sı 7.4'e ayarlandı.

Ksantin stok çözeltisi (3 mmol/L): 23 mg ksantin, 50 ml'lik bir balon joje içinde 5 ml 0.1 N NaOH ile hafifçe ısıtılarak çözündürüldü ve dH_2O ile 50 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman 10 kez sulandırıldı.

EDTA çözeltisi (0.6 mmol/L): 0.249 g EDTA (dihidrat) 1 L'lik balon joje içinde dH_2O ile çözündürülecek ve 1 L'ye tamamlandı.

Nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi (150 mmol/L) : 12.3 mg NBT 100 ml'lik bir balon jojede dH_2O ile çözündürülecek ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Na_2CO_3 çözeltisi (400 μ mol/L): 4.2 g Na_2CO_3 100 ml'lik bir balon jojede dH_2O ile çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Sığır albümini çözeltisi (1g/L): 100 mg sığır albümini 100 ml'lik balon jojede dH_2O ile çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

CuCl_2 (0.8 mmol/L): 10.7 mg CuCl_2 100 ml'lik balon jojede dH_2O ile çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Ksantin oksidaz enzim çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 20 mikromol alınarak 2ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırıldı.

Reaktif Karışımı: 20 tüplük bir seri analiz için 100ml'lik bir erlen içerisine 20 ml 10 kez sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı.

2.2.7.Eritrosit Lizatında ve Doku Homojenatında katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü

Eritrosit lizatı ve doku homojenatında katalaz aktiviteleri Sinha (1972)'nin belirlediği yöntem ile belirlendi. Bu yöntemler, H_2O_2 'nin CAT tarafından ayrıştırılmasına dayanmaktadır. Örnek tüpü, pH 7.0 olan 50 mM fosfat tamponu; 10 mM H_2O_2 ve numune içerir. H_2O_2 indirgeme hızı, 45 saniye boyunca 240 nm'de takip edildi. Oda sıcaklığında bir birim CAT tayini, 25 ° C'de pH 4.5'te her bir dakikada 1.0 mol H_2O_2 ayrıştırır ve CAT aktivitesi U/mgHb eritrosit ve U/ μ g protein olarak ifade edildi.

2.2.8. Hemoglobin (Hb) ve Protein Konsantrasyonları Ölçümü

Hemoglobin (Hb) Drabkin ve Austin (1935)'e göre siyanomethemoglobin metoduyla kalorimetrik olarak belirlendi. Dokudaki protein içeriği ise Lowry ve ark. (1951)'nin kalorimetrik metoduna göre test edildi.

Örnek ve standart tüplerine 1 mL homojenizat çözeltisi ve standart çözeltiler, kör tüpüne de 1 mL saf su eklendi.

Tüm tüplere 3 mL C reaktifi eklendi. (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşturulur. A reaktifi %2 Na_2CO_3 , % NaOH, % 0.16 Na-tartarat; B reaktifi ise %4 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 'dır).

Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

Tüm tüplere 300 μ L Folin-Fenol reaktifi vortekslenerek eklenecektir.

Oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi.

Absorbanslar 660 nm'de köre karşı okundu.

Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplandı.

2.2.9. Plazma Biyokimyasal Parametreleri

Karaciğer enzim aktivitelerinin tespitinde Aspartat aminotransferaz (AST), Alanin aminotransferaz (ALT), Alkalın fosfataz (ALP) parametreleri ile böbrek fonksiyonlarındaki değişikliğin belirlenmesinde bakılan üre ve kreatinin parametreleri spektrofotometrik olarak (Shimadzu 1601-UV Visible, Tokyo, Japan) Human liquiUV ticari test kitleri ile belirlendi. glukoz (Biolabo) Bioloba (Ref 87109, Fransa) ve total protein (TP) Human (Ref 157004, Almanya) ticari test kitleri ile belirlendi.

2.2.10. Histopatolojik Analizler için Dokuların Hazırlanması

2.2.11. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Sıçanların sakrifiye edilmesinden sonra göğüs kafesi yanında batın bölgesi cerrahi yöntemlerle açılmış ve batın bölgesinden karaciğer, böbrek ile bunun yanı sıra beyin dokuları alınmıştır. Alınan organlar histopatolojik doku takibine hazır hale getirilmiştir. Bu amaçla dokular, 0,5-1 cm² kadar büyüklüklerde organların farklı bölgelerinden küçük doku örnekleri alındı doku takip kasetlerine aktarıldı. Hazırlanan bu örnekler fiksasyon için %10'luk nötral tamponlu formalin içine konulmuştur. Günlük olarak değiştirilip yenilenen fiksatif içinde 5 gün süreyle bekletilmiş olan doku örnekleri akarsuda 1 gece bekletilmek suretiyle formaldehitten arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu basamaktan sonra farklı derişimlerdeki alkol solüsyonlarından geçirilerek dokularda bulunan suyun alınması sağlanmıştır ve bu aşamadan sonra şeffaflaştırma amacıyla ksilen solüsyonlarında aktarılmıştır. Ksilen solüsyonlarında bekletilen doku örnekleri önce yumuşak parafinde her saat değişmeli olarak 2 saat ve son olarak da 1 saat sert parafinde bekletilmiştir. Daha sonra aynı şekilde parafinde bloklanmıştır. Parafine gömülmüş olan dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak normal ve adhezivli lamlara aktarılmıştır. Alınan

kesitler daha sonra boyanmak üzere gruplandırılmıştır.

Histolojik doku takip metodu aşağıda özetlenmiştir. Histolojik doku takibi:

Dokunun incelemeye hazır hale getirilmesi için küçük doku parçalarına ayrılması (trimming)

Fiksasyon

% 10 nötral formalinde 5 gün fiksasyon (hergün fiksatif tazelenecek)

Doku takibi öncesi dokuların akarsuda yıkanıp fazla formaldehidin temizlenmesi- 30 dakika

Dehidratasyon

% 70, 80, 96'lık alkolde 1 saat

Absolü alkol 1 saat, Absolü alkol 1 saat Şeffaflandırma

Ksilende 30 dakika, ksilende 1 saat Parafinde bekletme ve gömme

Yumuşak parafin 1 saat, Sert parafin 1 saat, Parafine gömme

Parafine gömülen örneklerden mikrotom aracılığıyla 4-6 mikron kalınlığındaki kesitler klasik doku değerlendirmeleri için normal lamlara alınacaktır. Alınan kesitler daha sonra boyanmak üzere gruplandırılacaktır. Bu amaçla doku üzerinde mevcut olan/değişen genel histolojik özellikleri görüp değerlendirmek için Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyama yapılacaktır. Bu boyamada izlenecek metot aşağıda sıralanmıştır.

2.2.12. Hemotoksilen Eosin Boya Protokolü

Lam üstüne alınan doku örneklerinin deparafinizasyonu, 65 °C'lik etüvde 2 saat bekleterek parafinin erimesini sağlandı ve ksilende 3 kez toplamda 20 dakika bekletildi. Örneklerin hidrasyonunu sağlamak amacıyla birinci absolü alkolde 5

dakika, ikinci absolü alkolde, %96'lık alkolde, %80'lik alkol ve %70'lik alkolde 3 dakika bekletilmeyi takiben distile suda 5 dakika yıkandı. Sonra Harris Hematoksilen de 10 dakika bekletilerek çekirdek boyaması gerçekleştirildi. Boyanın fazlasını dokudan uzaklaştırmak amacıyla akan çeşme suyu altında bolca yıkama yapılarak eozin solüsyonuna aktarıldı. 5 dk eozin ile boyanan kesitler boyamadan sonra %80, %96 ve iki adet absolü alkolden geçirildikten sonra şeffaflaştırma amacıyla 5'er dakika 3 adet ksilen solüsyonunda tutuldu ve entellan kapatıldı.

2.2.13. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için DNA fragmantasyonu immünolojik yöntemle gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmente nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır.

2.2.14. TUNEL Boyama Protokolü

Bu teknik için ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kiti (Milipore S7101, USA) kullanıldı. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme olarak bilinen TUNEL metodu, hücrelerde meydana gelen apoptozis oranlarını belirlemede standart yöntemlerden biri olarak kullanılmaktadır. TUNEL metodu uygulanırken sırasıyla şu işlemler gerçekleştirilmiştir. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler lizinli lamlara (Menzel-Glasser) alınmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTaq Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon SA. Merck Millipore) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlenmiştir. Çalışmada lizinli lamlara (Menzel-Glasser) 5 mikron kalınlığında karaciğer, böbrek ve beyin doku kesitleri alınmıştır. Lizinli lamlara alınan doku

kesitleri etüvde (Nüve EN 500) 1 gece bekletilmiştir. Ksilolde deparafinize edilen kesitler 100, 96 ve 80 derecelik alkollerde 5'er dakika rehidre edilecek, daha sonra distile suya alınmıştır. Bu aşamadan sonra kesitler, PBS solüsyonunda 5 dk bekletilmiştir. Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem (Pap Pen) ile çizildikten sonra 1:500 oranında proteinaz K solüsyonun etki etmesini sağlamak amacıyla 25 dk bekletilmiştir. Proteinaz K uygulamasından sonra kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek amacıyla on dakika %3'lük H₂O₂ ile inkübe edilmiştir. Sonra kesitler yine tampon solüsyon ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Sonra kesitler equilibration tampon solüsyonunda 10 dk tutulmuştur. Bunun ardından % 70 Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme çalışma solüsyonunda 37° C lik etüvde 1 saat inkübasyona tabii tutulduktan sonra Stop/Wash Buffer solüsyonunda 10 dk bekletilmiştir. 1 saat inkübasyon süresinden sonra kesitler working strength stop/wash buffer (100 µL stop wash buffer+3400 µL distile su) ile 10 dk inkübe edildi. Tekrar PBS solüsyonuyla yıkanan kesitler TUNEL pozitif reaksiyonunun görünürlüğünü belirlemek amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyanmıştır. Bunu gerçekleştirmek için 30 µL DAB substratı 1470 µL DAB dilüsyon tampon solüsyonu ile karıştırılarak hazırlanmış ve buzdolabı ısısında karanlık bir ortamda kullanılmadan yarım saat önce dinlenmeye bırakılmıştır. Kesitler üzerine hazırlanan DAB solüsyonu aktarılarak yaklaşık 5 dk beklenmiştir. Sonrasında kesitler distile su ile yıkanmıştır. Lamların üzerin metil green boyası damlatılarak 10-15 sn beklenip zemin boyaması gerçekleştirilmiştir. Akarsuya alınan kesitler boyanın fazlası giderildikten sonra lamalar kurutulmadan alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Boyanan tüm örneklerin ışık mikroskobu altında değerlendirilmesinde; H&E'de boyanan karaciğer dokuları için; steatosis (karaciğer yağlanması ve yangısal durum), kupffer hücre aktivasyonu, hiperemi ve kanama alanları, hepatositlerde nekroz ve dejenerasyon alanları, sinusoidal dilatasyon ve bağ doku artışı, intersiyumlarda MNH inflamasyon alanlarının incelemeleri gerçekleştirilecek böbrek örneklerinde de glomerulusların bowman boşluğunda genişleme ve kapiller yumağında vakuolizasyon oluşumları görülmüştür. Tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon oluşumları ile korteks medular bölgede hiperemi, tubulus lumenlerinde

dökülmüş epitelyum hücrelerinin oluşturduğu kitle beyin örneklerinde nöronlarda vakolizasyon, hiperemi ve fokal glia hücreler inflamasyonu oluşturduğu gözlemlendi. Artan dozlarda MTF uygulamasının karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oluşan histopatolojik bulguları da şiddetlendirdiği belirlendi. inceleme sonuçları yok (-), ılımlı (+) ve orta (++), şiddetli (+++) olarak skorlanacak ve bunların istatistiksel analizleri (parametrik veya nonparametrik testlerle) yapılarak ifadeleri gerçekleştirilecektir. Immunohistokimyasal boyama için tunel immunoreaktiviteleri gözlenen alanlar “pozitif boyanma”, gözlenemeyen alanlar ise “negatif boyanma” olarak ifade edilecektir. Ayrıca ek olarak histopatolojik bulgular varsa bunlarda değerlendirmeye ilave edilecektir.

2.2.15. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonunda elde edilen veriler, SPSS 22 istatistik paket programında grup ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA testi uygulanarak hesaplandı. Post-Hoc olarak Duncan testinden faydalanılarak veriler "ortalama $\pm$ standart sapma" olarak ifade edilmiştir ($X \pm SD$). İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Lipid Peroksidasyonu ve Aktif Glutasyon (GSH) Seviyeleri Üzerine Etkileri

Çizelge 3.1. Metaflumizon'nun 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki MDA seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/gdoku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	1,33±0,32	3,18±0,23 ^c	2,60±0,95 ^b	2,98±0,90	2,47±0,20 ^c
MTF₅₀	1,36±0,43	3,64±0,94 ^{bc}	3,12±0,78 ^{ab}	3,27±0,43	3,59±1,26 ^b
MTF₁₀₀	1,77±0,82	4,14±0,78 ^{ab}	3,30±0,52 ^{ab}	3,38±0,31	3,13±0,62 ^{bc}
MTF₂₀₀	1,78±0,89	4,72±0,71 ^a	3,43±0,37 ^a	3,42±0,30	4,56±0,97 ^a

Her bir parametrenin istatistiksel analizi kendi içinde yapıldı. Değerler her biri 8 hayvandan oluşan bir grup için ortalama ± SD
*a-b aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark olarak verildi (p<0.05).

Oksidatif hasar sonucu LPO'nun son ürünü Malondialdehit (MDA) seviyeleri oksidatif stres belirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan tez çalışmasında MTF artan dozlarda (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg) uygulanan grupların karaciğer, böbrek ve testis dokularında MDA seviyeleri (Çizelge 3.1) kontrol grubuna göre anlamlı derecede (p<0.05) arttığı belirlendi.

Çizelge 3.2. Metaflumizon'nun 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki GSH seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Kan (nmol/ml)	Karaciğer (nmol/gdoku)	Böbrek (nmol/g doku)	Beyin (nmol/g doku)	Testis (nmol/g doku)
Kontrol	82,75±20,49 ^a	20,25±5,00 ^a	20,75±3,37 ^a	17,12±4,76 ^a	22,00±1,41 ^a
MTF₅₀	71,00±21,06 ^a	16,50±3,74 ^{ab}	15,75±3,37 ^b	14,87±3,90 ^{ab}	10,50±4,50 ^b
MTF₁₀₀	47,37±14,69 ^b	12,87±2,79 ^b	10,00±0,92 ^c	12,12±2,35 ^b	11,12±3,83 ^b
MTF₂₀₀	37,75±9,22 ^b	13,00±2,61 ^b	9,37±1,50 ^c	11,87±1,24 ^b	11,37±1,92 ^b

Her bir parametrenin istatistiksel analizi kendi içinde yapıldı. Değerler her biri 8 hayvandan oluşan bir grup için ortalama ± SD
*a-b aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark olarak verildi (p<0.05).

Oksidatif hasar sonucu antioksidan savunma sistemi üyesi olan enzimlerden GSH, yapılan tez çalışmasında değerlendirildiğinde MTF artan dozlarda (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg) uygulanan grupların karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında GSH seviyeleri (Çizelge 3.2) kontrol grubuna göre anlamlı derecede (p<0.05) azaldığı belirlendi.

3.2. Antioksidan enzim seviyeleri üzerindeki etkileri

Çizelge 3.3. Metaflumizon'nun 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki SOD seviyeleri üzerine etkisi

Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/µg protein)	Böbrek (U/µg protein)	Beyin (U/µg protein)	Testis (U/µg protein)
Kontrol	15,43±2,51 ^c	2,44±0,63	2,58±0,86 ^d	4,34±0,69	3,66±0,60
MTF₅₀	16,65±3,32 ^c	2,84±0,45	2,91±0,54 ^{bc}	4,88±0,53	3,78±0,48
MTF₁₀₀	23,68±4,63 ^b	2,76±0,54	3,22±0,60 ^{ab}	5,30±2,00	3,90±1,52
MTF₂₀₀	26,20±7,38 ^a	2,81±0,46	3,45±0,81 ^a	5,07±0,86	4,77±1,03

Her bir parametrenin istatistiksel analizi kendi içinde yapıldı. Değerler her biri 8 hayvandan oluşan bir grup için ortalama ± SD
*a-b aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark olarak verildi (p<0.05).

Reaktif oksijen türleri ve süperoksit anyon radikallerine karşı antioksidan savunma da görev alan enzimlerden biri olan süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri (Çizelge 3.3) yapılan tez çalışmasında değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre MTF₅₀ en düşük doz grubunun eritrosit ve böbrek SOD seviyelerinde artış gözlemlendi. Paralel olarak diğer gruplar da artan dozlarda MTF'a maruz bırakılması sonucunda SOD seviyelerinin anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterdiği belirlendi.

Çizelge 3.4. Metaflumizon'un 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki CAT seviyeleri üzerine etkisi

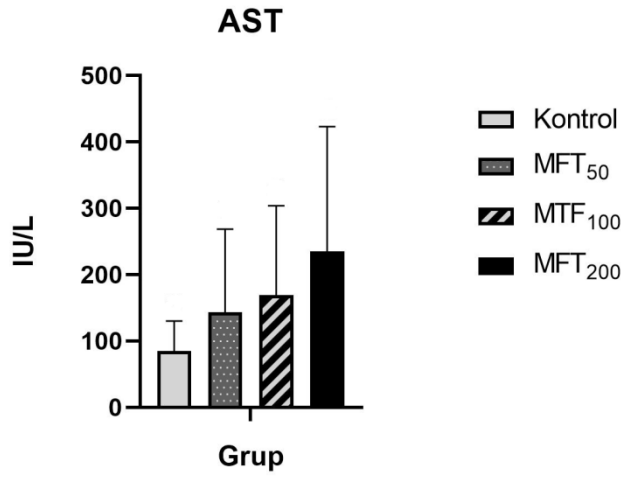
Gruplar	Eritrosit (U/gHb)	Karaciğer (U/ μ g protein)	Böbrek (U/ μ g protein)	Beyin (U/ μ g protein)	Testis (U/ μ g protein)
Kontrol	280,53 $\pm$ 74,11 ^d	101,02 $\pm$ 35,94	78,14 $\pm$ 30,49	118,51 $\pm$ 19,72 ^b	110,69 $\pm$ 52,52
MTF₅₀	589,96 $\pm$ 160,25 ^c	74,50 $\pm$ 14,81	63,93 $\pm$ 10,42	142,40 $\pm$ 19,87 ^{ab}	122,27 $\pm$ 30,17
MTF₁₀₀	882,37 $\pm$ 258,89 ^b	89,64 $\pm$ 33,53	71,61 $\pm$ 14,01	168,84 $\pm$ 31,53 ^a	126,94 $\pm$ 35,08
MTF₂₀₀	1266,93 $\pm$ 302,95 ^a	101,06 $\pm$ 32,08	74,34 $\pm$ 12,87	156,61 $\pm$ 31,21 ^a	137 $\pm$ 20,78

Her bir parametrenin istatistiksel analizi kendi içinde yapıldı. Değerler her biri 8 hayvandan oluşan bir grup için ortalama $\pm$ SD
^{a-b} aynı sütunda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark olarak verildi ($p < 0.05$).

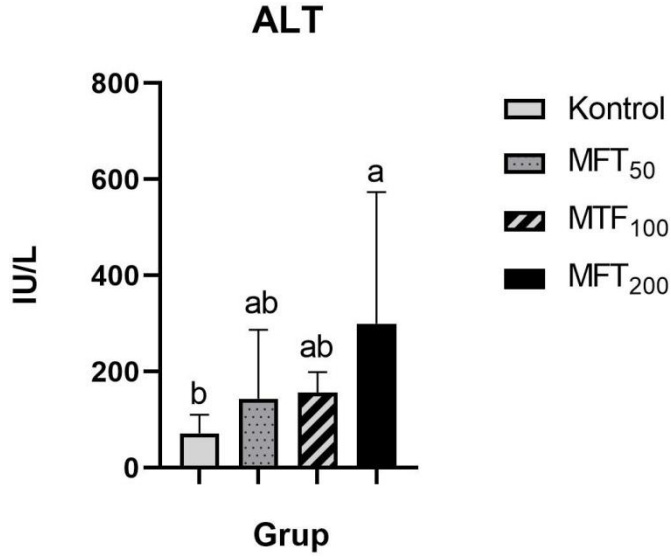
Bir diğer antioksidan enzim olan CAT seviyeleri (Çizelge 3.4) değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre MTF₅₀ en düşük doz grubunun eritrosit ve beyin CAT seviyelerinde artış gözlemlendi. Artan dozlarda MTF'a maruz bırakılması sonucunda CAT seviyelerinin anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış gösterdiği belirlendi.

3.3. Plazmadaki biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri

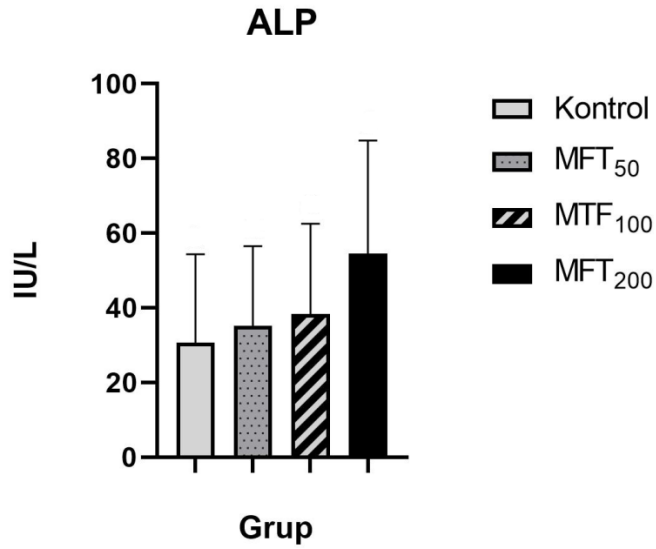
Plazmada AST (Şekil 3.1), ALT (Şekil 3.2), ALP (Şekil 3.3), üre (Şekil 3.4), kreatinin (Şekil 3.5), glukoz (Şekil 3.6) ve total protein (Şekil 3.7) aktiviteleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre artan dozlarda MTF (50, 100, 200 mg/kg) uygulamasının bu seviyeleri anlamlı derecede arttırdığı rapor edildi ($p < 0.05$).



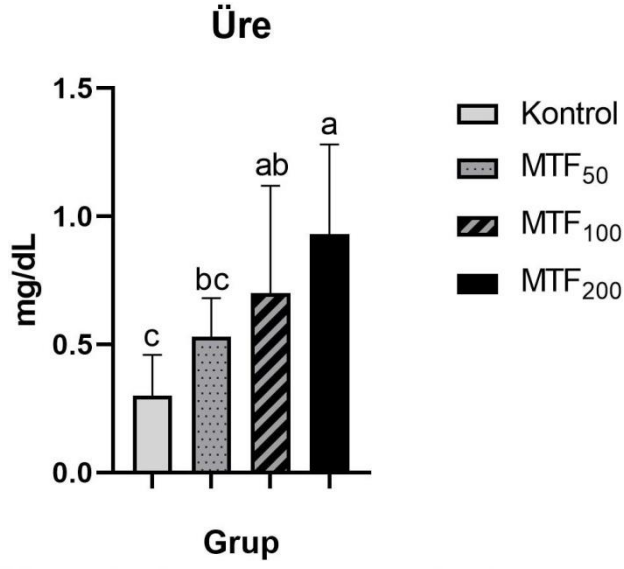
Şekil 3.1 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma AST düzeyleri üzerine etkisi.



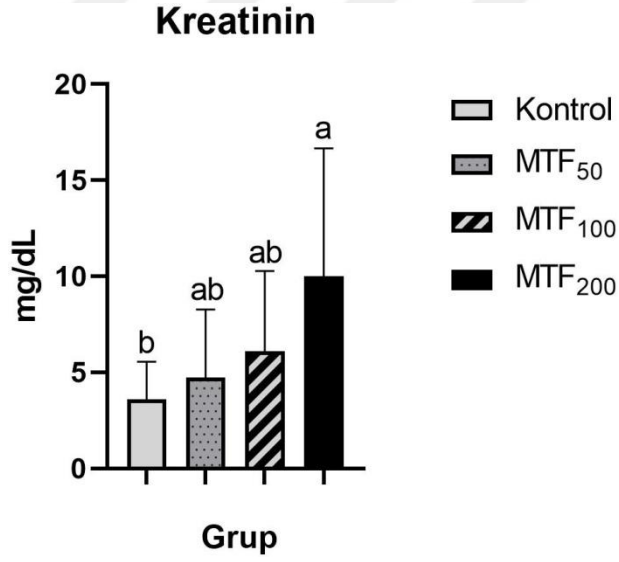
Şekil 3.2 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma ALT düzeyleri üzerine etkisi^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



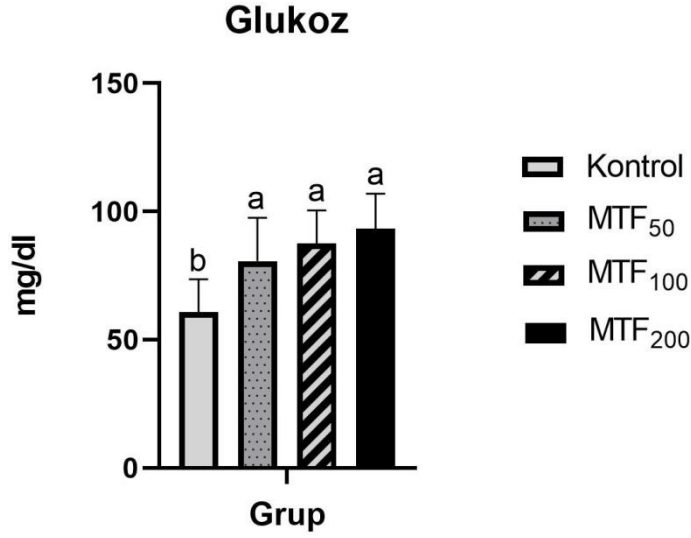
Şekil 3.3 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma ALP düzeyleri üzerine etkisi.



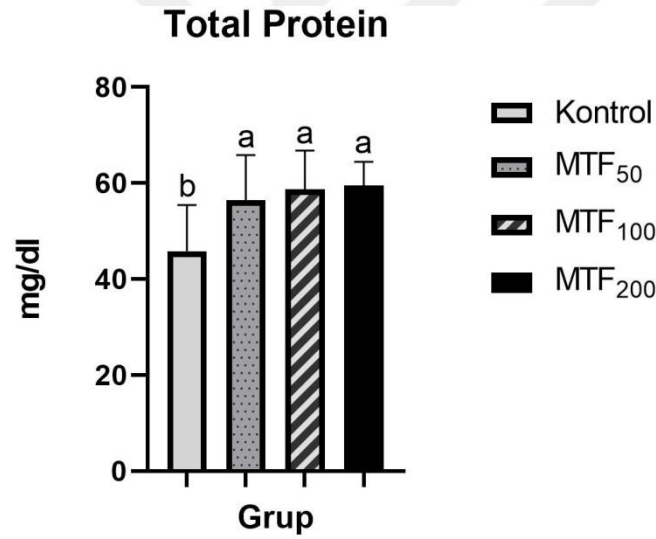
Şekil 3.4 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma üre seviyeleri üzerine etkisi. ^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3.5 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma kreatinin seviyeleri üzerine etkisi. ^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3.6 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma glukoz seviyeleri üzerine etkisi. ^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3.7 50, 100 ve 200 mg/kg miktarlarında uygulanan Metaflumizonun ratların plazma total protein seviyeleri üzerine etkisi. ^{a,b,c}; farklı harfler istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$).

3.4. Klinik Bulgular

Yapılan çalışmada MTF₅₀, MTF₁₀₀, MTF₂₀₀ gruplarında yer alan ratlarda klinik bulgu olarak; durgunluk, bitkinlik, kıl ve tüylerde karışık bir görünüm, yem ve su

tüketiminde azalma ile iştahsızlık dikkati çekti. Kontrol grubunda ise herhangi bir klinik bulguya rastlanmadı. Belirlenen klinik bulguların şiddeti verilen toksik maddenin alınma süresine bağlı olarak da gün geçtikçe daha şiddetlendi. Ayrıca bu klinik bulgular MTF₂₀₀ grubunda diğer MTF gruplarına göre daha dikkat çekici bir görünümdeydi.

3.5. Canlı Ağırlık Artışı

Çalışmada, 28 günlük deneme periyodu aşamasında; ratlarda canlı ağırlık farklılıklarını belirlemek suretiyle çalışmanın başlangıç döneminde ve 7, 14, 21 ve 28. günlerde canlı ağırlık tartımları belirlendi. Deneme sonrası ile deneme öncesi ağırlıkları arasındaki farklılıklar uygun istatistik hesaplama yöntemleriyle belirlendi. Elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Çizelge 3.5’de sunuldu.

Çizelge 3.5. Metaflumizon’nun 50, 100, 200 mg/kg dozlarına maruz bırakılan ratların 7,14, 21 ve 28.günlerde canlı ağırlıkları üzerine etkisi

Gruplar	7.gün	14.gün	21.gün	28.gün
Kontrol grubu	239,12±25,54 ^a	227,87±19,67 ^a	216,87±22,72 ^a	208,25±21,81 ^a
MTF₅₀ grubu	239,62±19,42 ^a	214,75±20,85 ^a	204,00±26,98 ^a	198,62±26,98 ^a
MTF₁₀₀ grubu	236,25±10,02 ^a	226,37±14,54 ^a	216,75±12,04 ^a	206,50±6,90 ^a
MTF₂₀₀ grubu	254,12±26,10 ^a	224,00±14,94 ^a	213,00±15,13 ^a	199,62±15,78 ^a

Her bir parametrenin istatistiksel analizi kendi içinde yapıldı. Değerler her biri 8 hayvandan oluşan bir grup için ortalama ± SD

3.6. Patolojik değişimler

3.6.1. Makroskopik Bulgular

3.6.1.1. Kontrol Grubu

Bu grupta yer alan ratların nekropsisinin yapılarak elde edilmiş bulgularında organlarda herhangi makroskopik bir lezyona rastlanmadı.

3.6.1.2. MTF₅₀ Grubu

Bu grupta yer alan ratların karaciğer ve böbreklerinin makroskopik incelenmesinde diğer MTF gruplarına göre belirgin bir lezyona rastlanmadı ancak karaciğer ve böbrek dokularının renginin genellikle koyu kahverengiye yakın bir görünüme sahip olduğu belirlendi Testislerin dış yüzeyindeki damarlar hiperemik bir görünümdeydi. Aynı hiperemik görünüme beyin yüzeyinde de rastlandı.

3.6.1.3. MTF₁₀₀ Grubu

Karaciğerler de boz beyaz renkte odaklara rastlandı. Karaciğerin koyu kahverengimsi bir renge sahip olduğu belirlendi. Gruptaki tüm deneklerde böbreklerin dış yüzeyinde bazı olgularda kesit yüzünde, toplu iğne başı büyüklüğünde boz beyaz odaklar belirlendi. Testisler kontrol grubu testislerine göre daha küçük bir yapıda olup damarların hiperemik olduğu görüldü. Gruptaki tüm deneklerde beyin damarlarının hiperemik olduğu görüldü.

3.6.1.4. MTF₂₀₀ Grubu

Bu grupta yer alan ratların nekropsi incelemelerinde karaciğerlerinin visceral yüzeylerinde, yaygın bir görünüme sahip grimsi beyaz renkte odaklar belirlendi. Bu karaciğerlerin yüzeyine kesitler yapıldığında, bu odaklara kesit yüzlerinde de

olduğu fark edildi. Karaciğerler küçük bir görünümde olup, bazı olgularda solgun, bazı olgularda da hafif kahverengimsi-siyah görünüme sahip olduğu belirlendi. Olguların hemen hemen bütününde böbreklerin dış yüzeyinde ve kesit yüzeyinde toplu iğne başı büyüklüğüne yakın boz beyaz odaklara rastlandı. Böbrek dokularının bazı örneklerinde hafif solgun, bazı örneklerde ise, alacalı bir görünüme sahip olduğu belirlendi. Testislerin, kontrol grubu testislerine göre genellikle küçük yapıda, hafif yumuşak kıvamda olup, damarların hiperemisi dikkat çekiciydi. Tüm olgularda beynin dış yüzeyindeki damarlar hiperemikti.

3.6.2. Histopatolojik Bulgular

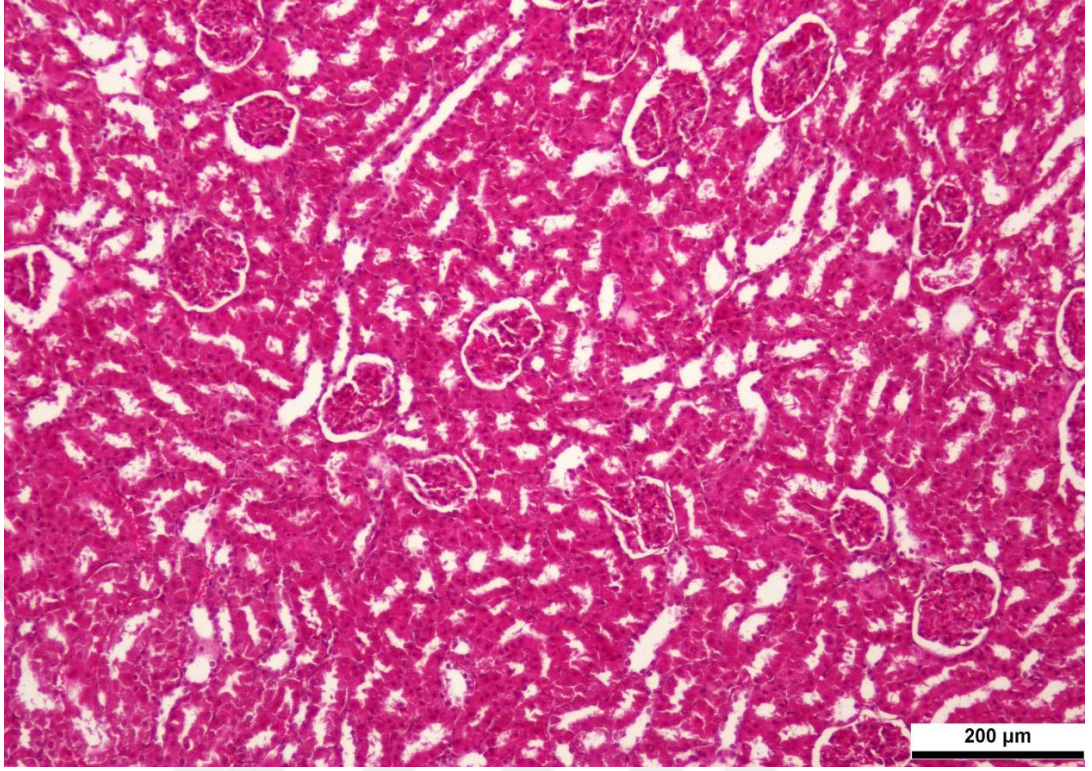
Karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokularının histopatolojilerinin istatistik değerlendirilmesi Çizelge 3.6’da belirtilmiştir.

3.6.2.1. Kontrol Grubu

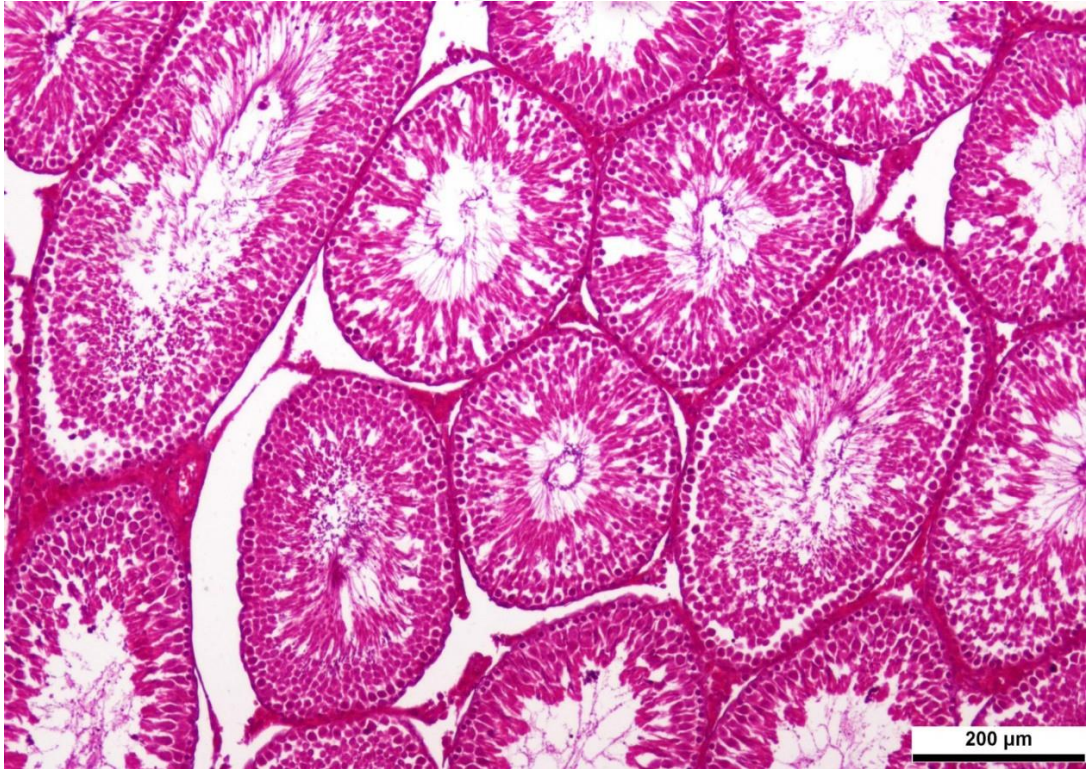
Bu grupta bulunan ratlarda karaciğer (Resim 3.1), böbrek (Resim 3.2), testis (Resim 3.3), beyin (Resim 3.4) normal histolojik yapıda olduğu belirlendi. Histopatolojik olarak herhangi bir bulguya rastlanmadı.



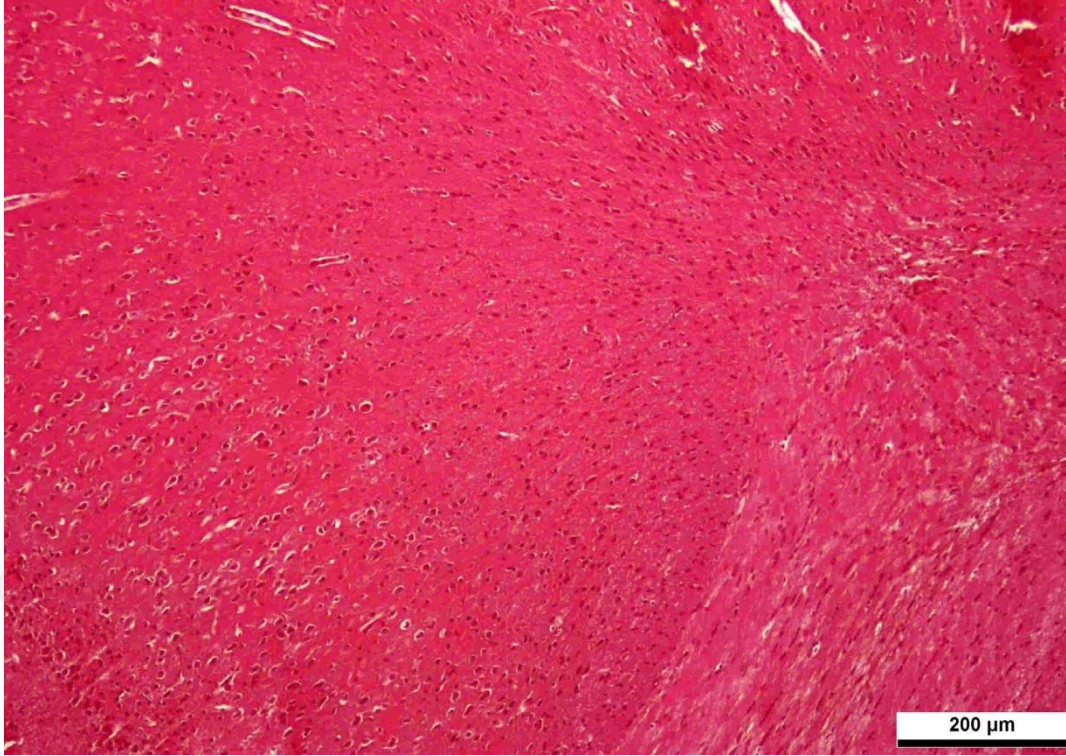
Resim 3.1. Kontrol grubu karaciğer dokusunun histopatolojik görüntüsü



Resim 3.2. Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü



Resim 3.3. Kontrol grubu testis dokusunun histopatolojik görüntüsü

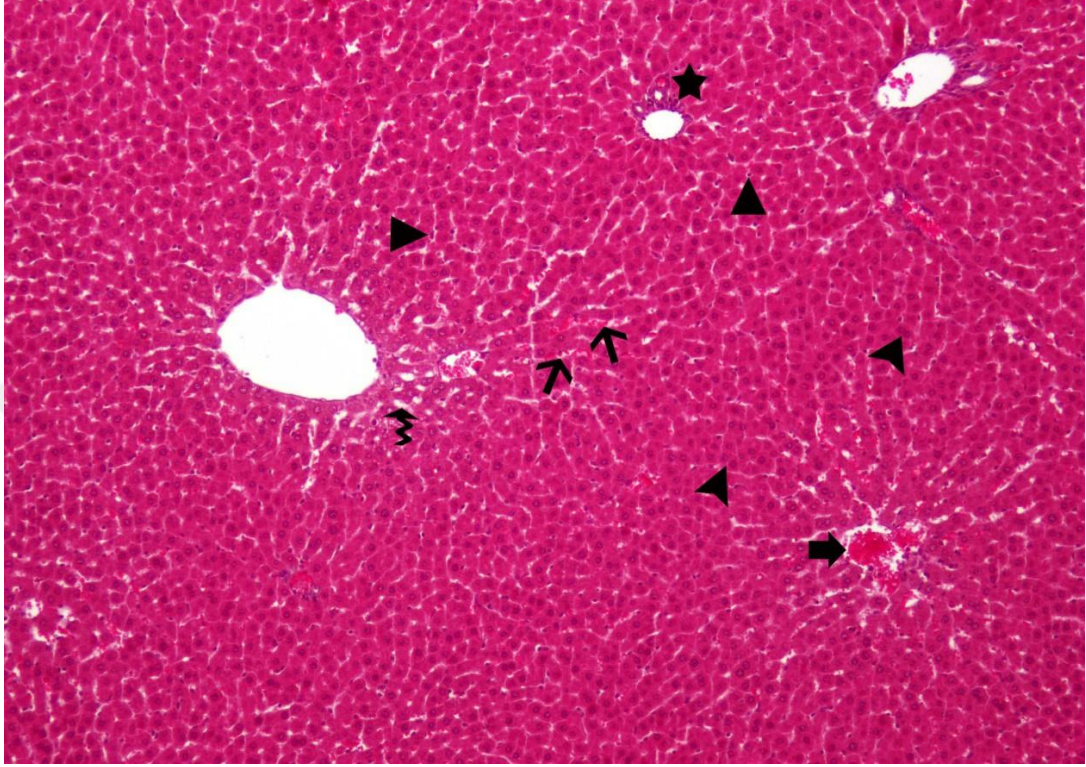


Resim 3.4. Kontrol grubu beyin dokusunun histopatolojik görüntüsü

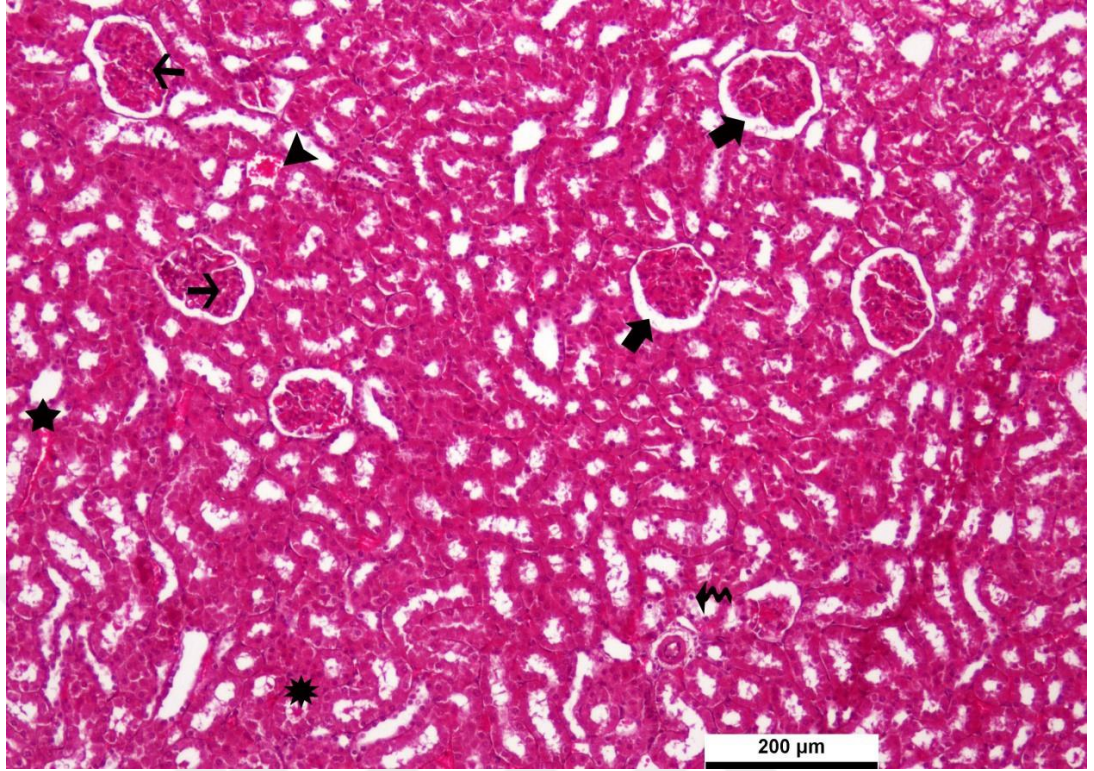
3.6.2.2. MTF₅₀ Grubu

Karaciğerlerdeki sinuzoid yapısının hafif hiperemik ve genişlemiş olduğu görüldü (Resim 3.5.). Sinuzoidlerde az miktarda Kupffer hücrelerine de rastlandı. Sentrilobüler bölgede ki hepatosit sahasında dejeneratif alanlar görüldü. parankim ve hidropik dejenerasyon gözlemlendi. Periportal bölgedeki hepatositlerin bazılarında hücre çekirdeğinin yoğunlaştığı ve çift çekirdekli olduğu belirlendi. Glomeruluslar genellikle hafif hiperemik ve bir kısmı dilatasyona uğramış, aynı zaman da bowman boşluğunun da genişlemiş olduğu fark edildi (Resim 3.6.). Çoğu olgularda proksimal tubuluslarda dejeneratif değişikliklerin hakim olduğu belirlendi. Bununla birlikte proksimal tubulusların bazılarında epitel hücrelerinin vakuoler dejenerasyona uğramış olduğu gözlemlendi. MTF₅₀ grubuna ait testislerin mikroskopik incelemesinde orta şiddette dejeneratif değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Tubulus seminiferus kontortus (TSK) epitelleri genellikle dejeneratif idi. Bazı TSK'larda dejenere spermatogonyumların lumen içerisinde bulundukları dikkati çekti. Bazı spermatogonyumlarda vakuolizasyon olumlarına rastlandı (Resim 3.7.).

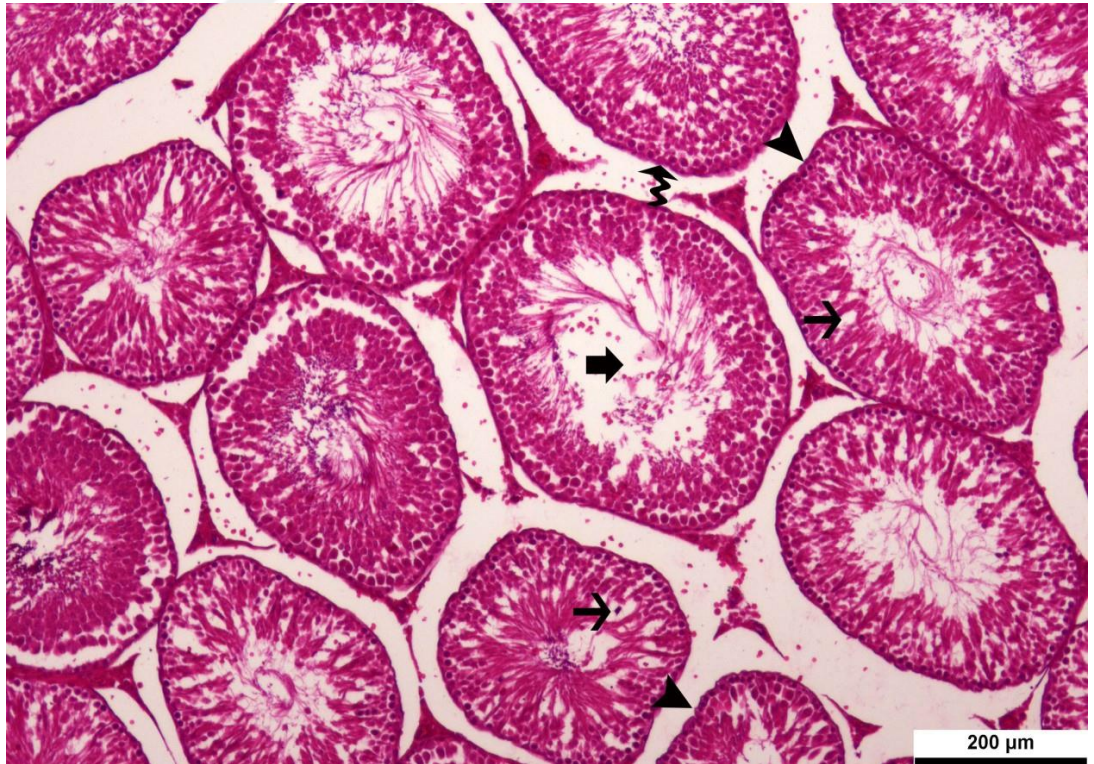
Beyin parankiminde, bazı nöronlarda dejeneratif değişiklikler ve nöronofaji görüldü (Resim 3.8.).



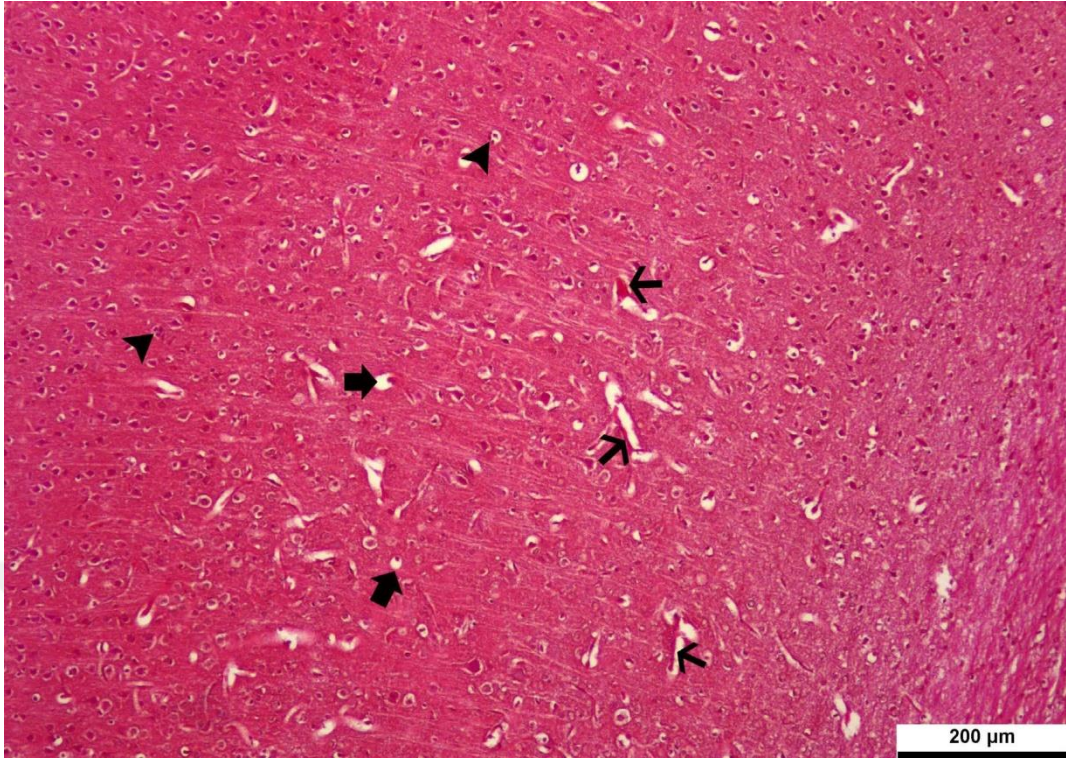
Resim 3.5. MTF₅₀ grubu karaciğer örneklerinde, vena sentralislerde orta şiddette hiperemi (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi (ince ok), vena centralis çevresindeki hepatositlerde orta şiddette dejeneratif değişiklikler (kıvrık ok), bazı hepatositlerde çift çekirdek oluşumu (ok başı), Periportal bölgede safra kanal hiperplazisi (beş köşeli yıldız), Kupffer hücre aktivasyonu (içi dolu üçgen) HE X10



Resim 3.6. MTF₅₀ grubu böbrek dokularında, Glomerulus bowman boşluğunda genişleme (kalın ok), glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları (ince ok), kortikal bölgede kanama alanı (ok başı), kortikomedüller bölgedeki damarlarda hiperemi (beş köşeli yıldız), tubulus lümenlerinde dökülmüş epitel hücrelerinin oluşturduğu kitle (on köşeli yıldız) HE. X10



Resim 3.7. MTF₅₀ grubu Testis dokularında, TSK'da spermatogenetik hücrelerde veziküler görünüm, spermatidler şekillenmemiş ve lumen boşalmış bir görünümde (kalın ve ince ok),TSK bazal membranındaki sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (kırıkk ok), TSK lümeninde anormal görünüm (okbaşı),HE. X10

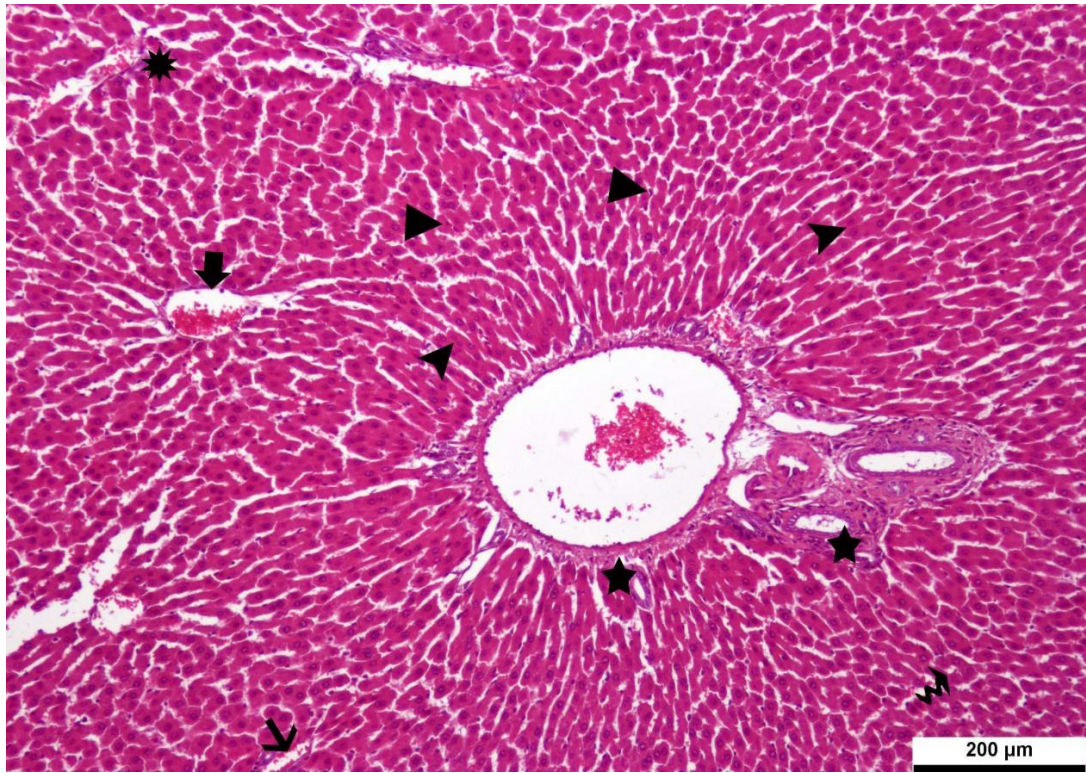


Resim 3.8. MTF₅₀ grubu beyin dokusunda nöronlarda vakuolizasyon oluşumu (kalın ok), damarlarda orta şiddette hiperemi (ince ok), nöronlar çevresinde fokal glia hücre infiltrasyonu alanları (ok başı) HE. X10

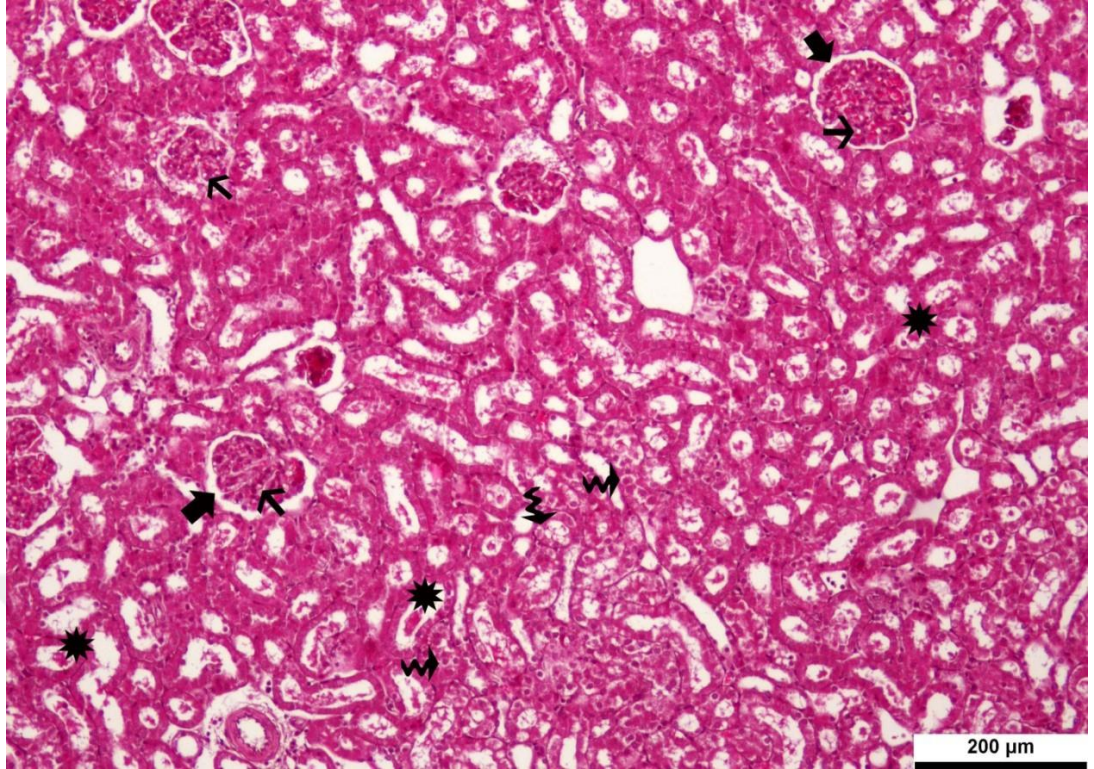
3.6.2.3 MTF₁₀₀ Grubu

Karaciğerin yapılan mikroskopik incelemesinde sinuzoidler de hiperemik ve genişlemiş olduğu belirlendi. Sinuzoidler arasında Kupffer hücrelerinin sayısında artış olduğu görüldü. Portal alanlarda fokal mononükleer hücre infiltrasyonları, periportal bölgedeki safra kanalları sayısında artış gözlemlendi. Sentrilobüler alanlardaki hepatositlerde hidropik dejenerasyon alanlarının daha belirgin olduğu fark edildi (Resim 3.9.). Periasiner alanlardan başlamak üzere, hepatositlerde yaygın dejenerasyon sahaları ile bazı hepatositlerin stoplazmalarında eozinofilik görünümün hakim olduğu belirlendi. Glomerulusların hiperemik ve bowman boşluğunun genişlemiş olduğu görüldü. Proksimal tubuluslarda dejeneratif değişiklikler fark edildi. Bazı proksimal tubulusların epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon sahalarına rastlandı (Resim 3.10.). Tubulusların çoğunun lumeni, dökülmüş epitel hücreleri ile doluydu. Testislerde tubulus seminiferus kontortus (TSK) epitellerinde orta şiddette dejeneratif değişiklikler bulunmaktaydı. Bazı TSK lumenlerindeki

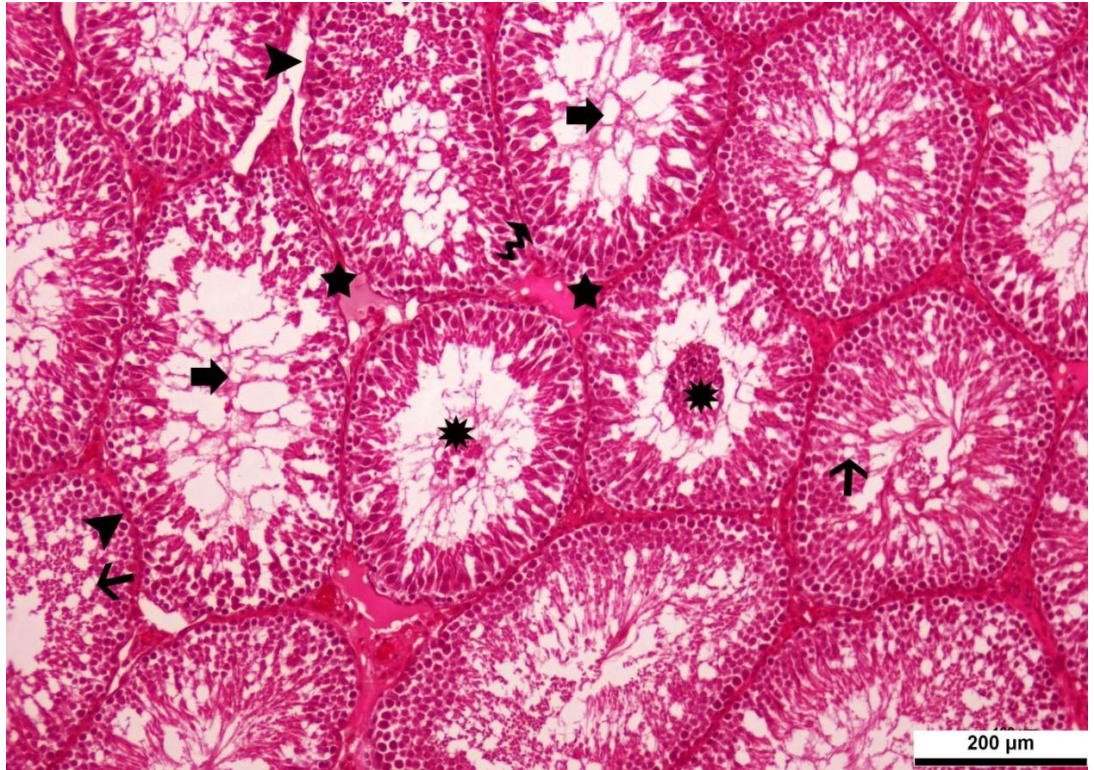
spermatozoonların sayısında azalma olduğu belirlendi. Sertoli hücreleri genellikle seçilebiliyordu. Bazı TSK'ların lumeni, dejenere ve dökülmüş spermatogenetik hücrelerle dolu bir görünümdeydi (Resim 3.11.). Bazı olgularda tunika albuginea ve intertubuler alanlardaki bağ dokuda, pembe homojen görünümlü hiyalinizasyon bölgeleri şekillenmişti. Beyinde kapillar damarlar genellikle hiperemikti. Bazı nöronlarda vakuolizasyon ve nöronofaji görüldü (Resim 3.12.)



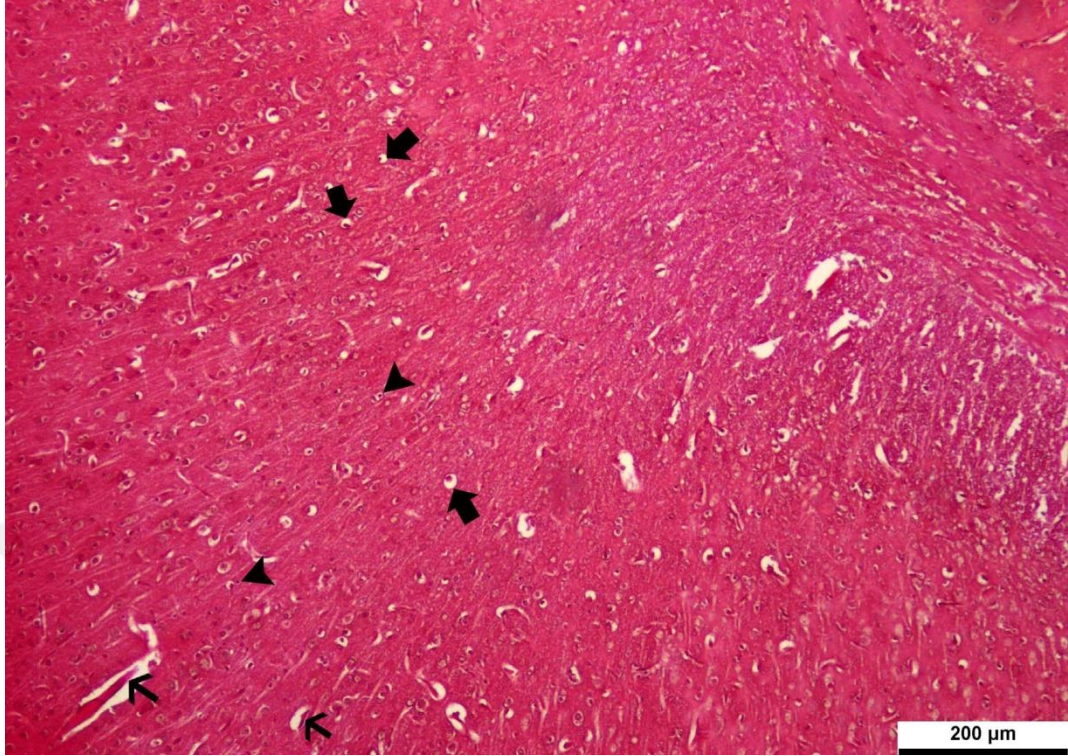
Resim 3.9. MTF₁₀₀ grubu **Karaciğerde**, vena sentralislerde şiddetli hiperemi (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi (ince ok), vena centralis çevresindeki hepatositlerde orta şiddette dejeneratif değişiklikler (kıvrık ok), bazı hepatositlerde çift çekirdek oluşumu (ok başı), Periportal bölgede safra kanal hiperplazisi (beş köşeli yıldız), Portal alanlarda ve intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları (on köşeli yıldız), Kupffer hücre aktivasyonu (içi dolu üçgen) HE. X10



Resim 3.10. MTF₁₀₀ grubu **Böbrekte**, Glomerulus bowman boşluğunda genişleme (kalın ok), glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları (ince ok), tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları (kırık ok), tubulus lümenlerinde dökülmüş epitel hücrelerinin oluşturduğu kitle (on köşeli yıldız) HE. X10



Resim 3.11. MTF₁₀₀ grubu **Testis**, TSK'da spermatogenetik hücrelerde veziküler görünüm, spermatidler şekillenmemiş ve lumen boşalmış bir görünümde (kalın ve ince ok),TSK bazal membranındaki sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (kırık ok), TSK lümeninde atrofik görünüm (okbaşı),intersitisyel bölgede hyalinizasyon (beş köşeli yıldız),TSK'larda lumende, dejenere olmuş germ hücrelerinin oluşturduğu yoğunlaşmış kitle (on köşeli yıldız)HE. X10

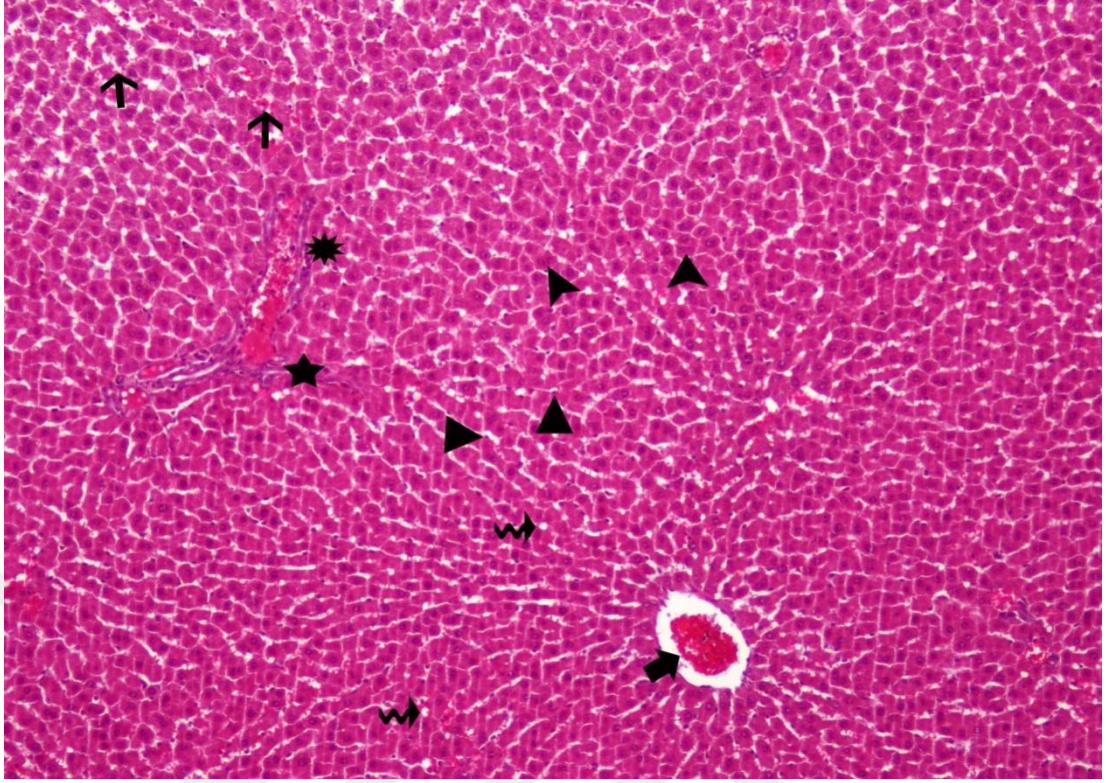


Resim 3.12. MTF₁₀₀ grubu **Beyin**, nöronlarda vakuolizasyon oluşumu (kalın ok), damarlarda şiddetli hiperemi (ince ok), nöronlarçevresinde fokal glia hücre infiltrasyonu alanları (ok başı) HE. X10

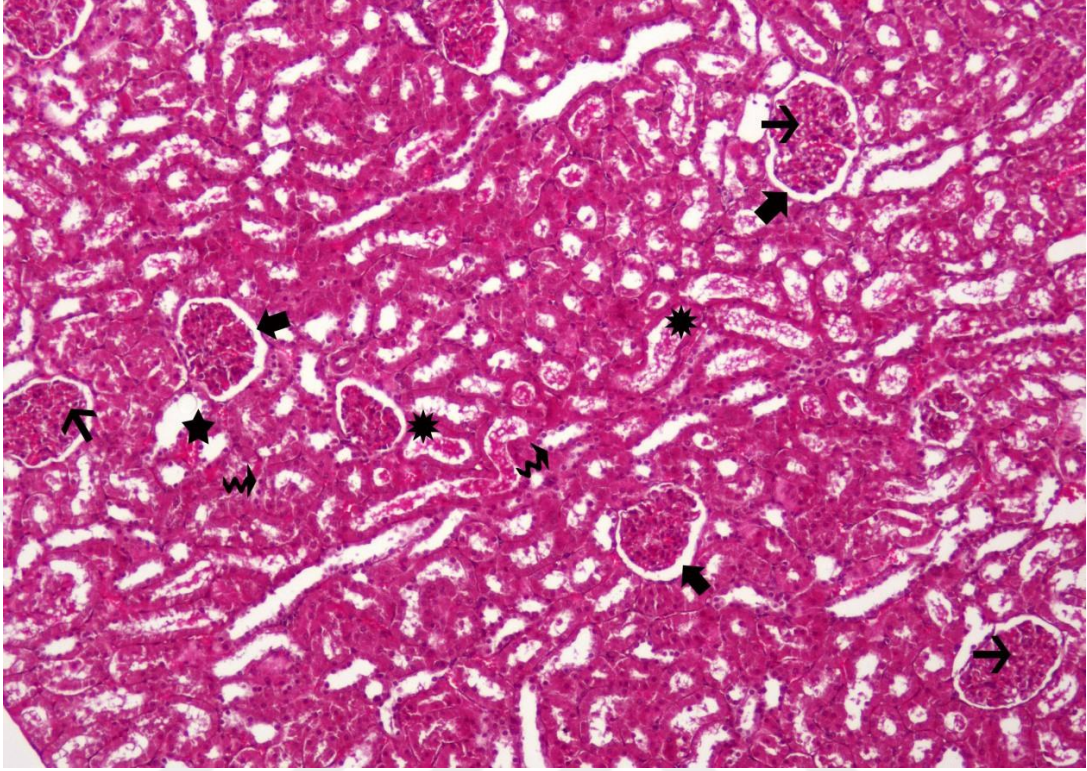
3.6.2.4. MTF₂₀₀ Grubu

Yapılan mikroskopik incelemelerde karaciğerin şiddetli hiperemik olduğu belirlendi (Resim 3.13.). Aynı şekilde sinuzoidlerin de hiperemik ve genişlemiş olduğu belirlendi. Damar endotel hücrelerinin şişkin görünümde olduğu tespit edildi. Vena centralislerde hiperemiye rastlandı. Kupffer hücre aktivasyonu belirgindi. Bazı olgularda karaciğer parankim yapısı tamamen kaybolmuştu (disorganizasyon). Sentrilobüler alanlardaki hepatositlerde şişme ve vakuolizasyon oluşumları tespit edildi. Hepatositler arasındaki boşluğun genişlemiş olduğu tespit edildi. Vakuolizasyonun şekillendiği hepatositlerde hücre çekirdeğinin çevresinde birden fazla vakuole rastlandı. Periasiner alanlardan başlamak üzere hepatositlerde yaygın dejenerasyon sahaları görüldü ve bazı hepatositlerin stoplazmalarında eozinofilik bir görünüm fark edildi. Özellikle periportal alanlardaki hepatositlerde nükleuslardaki patolojik değişiklikler daha belirgindi. Perisentral bölgedeki bazı hepatositlerin çift

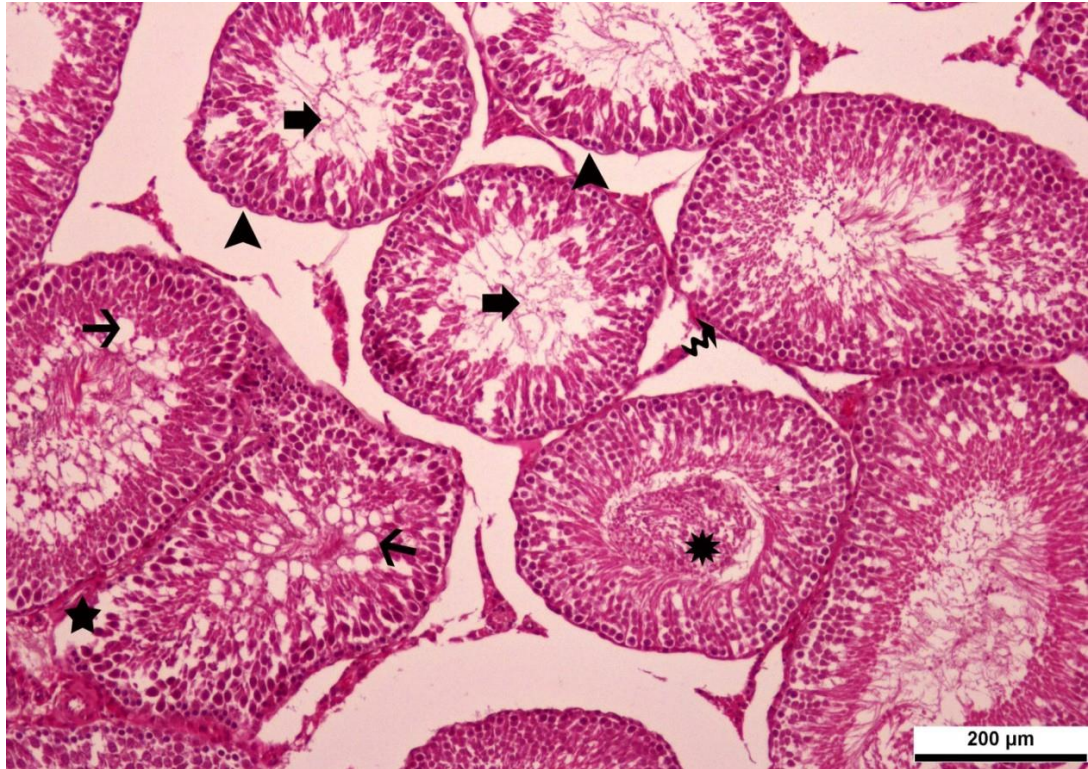
çekirdekli olduğu belirlendi. Böbrekte korteks ve medulladaki damarlar şiddetli derecede hiperemik olduğu görüldü. Glomeruluslar genellikle hiperemik ve dilatasyona uğramış bir görünümde olup; bowman boşluğunun genişlemiş olduğu fark edildi. Tubulus epitelyum hücrelerinde dejeneratif değişikliklere rastlandı. Özellikle proksimal tubulus epitellerinde dejeneratif değişiklikler daha belirgindi. Bazı proksimal tubulusların epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon sahaları görüldü. Tubulusların çoğunun lumenleri, dökülmüş epitel hücreleri ile dolu idi (Resim 3.14.). Testislerde genellikle dejeneratif değişiklikler belirgindi (Resim 3.15.). Tubulus seminiferus kontortuslarda (TSK) epitel hücrelerinde vakuolizasyonlar ile karakterize dejeneratif değişikliklere rastlandı. Bu dejeneratif değişikliklerin şekillendiği bazı TSK'ların lumenleri, dökülmüş spermatogenetik hücrelerle dolu olup, sıkı, yoğunlaşmış bir görünüm kazanmıştı. Bazı TSK'larda spermatogenetik hücreler veziküler bir görünüm almıştı, spermatidlerin şekillenmediği görüldü, lumenleri de tamamen boşalmış bir durumdaydı. Sertoli hücreleri genellikle belirgindi. Bazı olgularda Tunika albuginea ve intertubuler alanlardaki bağ dokuda, pembe homojen görünümü ile hiyalinizasyon alanları dikkati çekti. Beyin, kapillar damarlar hiperemik olduğu belirlendi. Perivasküler dilatasyon görüldü. Nöron dejenerasyonu ile birlikte nöronofaji ve perivasküler mononükleer hücreinfiltrasyonu dikkati çekti (Resim 3.16.).



Şekil 3.13. MTF₂₀₀ grubu **Karaciğerde**, vena sentralislerde şiddetli hiperemi (kalın ok), sinüzoidal dilatasyon ve hiperemi (ince ok), vena centralis çevresindeki hepatositlerde orta şiddette degeneratif değişiklikler (kıvrık ok), bazı hepatositlerde çift çekirdek oluşumu (ok başı), Periportal bölgede safra kanal hiperplazisi (beş köşeli yıldız), Portal alanlarda ve intersitisyumda mononükleer hücre infiltrasyonları (on köşeli yıldız), Kupffer hücre aktivasyonu (içi dolu üçgen) HE. X10

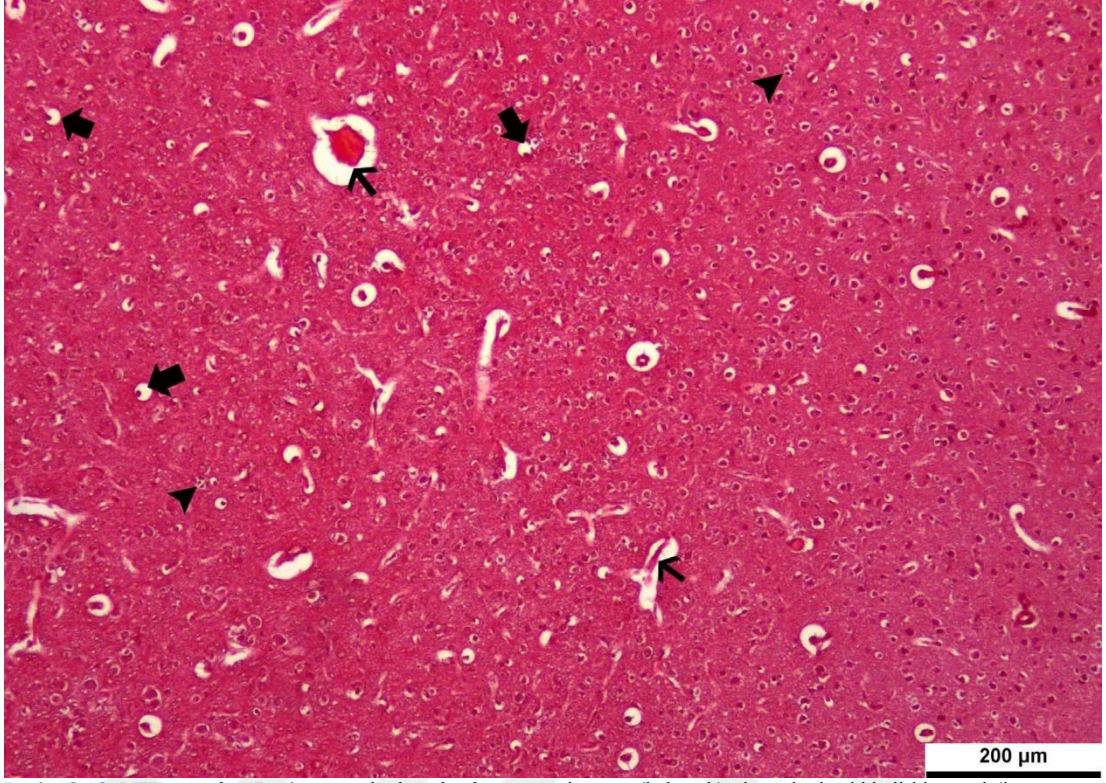


Resim 3.14. MTF₂₀₀ grubu, Glomerulus bowman boşluğunda genişleme (kalın ok), glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyon oluşumları (ince ok), tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları (kıvrık ok), kortikomedüller bölgedeki damarlarda hiperemi (beş köşeli yıldız), tubulus lümenlerinde dökülmüş epitel hücrelerinin oluşturduğu kitle (on köşeli yıldız) HE. X10



Resim 3.15. MTF₂₀₀ grubu, **Testis**, TSK'da spermatogenetik hücrelerde veziküler görünüm, spermatidler şekillenmemiş ve lumen boşalmış bir görünümde (kalın ve ince ok),TSK bazal membranındaki sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler

(kıvrık ok), TSK lümeninde atrofik görünüm (okbaşı), intersitisyel bölgede hyalinizasyon (beş köşeli yıldız), TSK'larda lumende, dejenere olmuş germ hücrelerinin oluşturduğu yoğunlaşmış kitle (on köşeli yıldız) HE. X10



Resim 3.16. MTF₂₀₀ grubu, **Beyin**, nöronlarda vakuolizasyon oluşumu (kalın ok), damarlarda şiddetli hiperemi (ince ok), nöronlar çevresinde fokal glia hücre infiltrasyonu alanları (ok başı) HE. X10

Çizelge 3.6. 50, 100, 200 mg/kg dozlarda Metafumizon uygulamasının ratlar da karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokularının histopatolojisinin istatistikseldeğerlendirmesi

Organ	Histopatolojik Bulgu	Kontrol	MTF ₅₀	MTF ₁₀₀	MTF ₂₀₀	“P” DEĞERLERİ
Karaciğer	Karaciğerlerde Venacentraliste hiperemi	0,40±0,78 ^b	1,10±0,00 ^a	1,21±0,66 ^a	1,72±0,74 ^a	0,000
	Karaciğerlerde Çift çekirdekli hepatositoloşumları	0,13±0,38 ^b	1,12±0,07 ^a	0,96±0,38 ^a	1,35±0,46 ^a	0,000
	Periportal bölgede safrakanal hiperplazisi	0,27±0,50 ^b	1,12±0,70 ^a	1,33±0,73 ^a	1,72±0,74 ^a	0,000
	İntersitisyumda MNHİnfiltrasyon alanları	0,27±0,50 ^b	1,22±0,35 ^b	1,61±0,52 ^b	1,72±0,74 ^a	0,000
	Kupffer hücre aktivasyonu	0,27±0,50 ^c	1,23±0,35 ^b	1,73±0,50 ^b	2,36±0,70 ^a	0,000
Böbrek	Glomerulus bowman boşluğunda genişleme	0,27±0,50 ^c	1,25±0,35 ^b	1,50±0,50 ^b	2,36±0,70 ^a	0,000
	Glomerulus kapillar yumağında vakuolizasyonoloşumları	0,30±0,55 ^c	1,21±0,14 ^b	1,53±0,47 ^b	2,36±0,70 ^a	0,000
	Tubulus epitel hücrelerindevakuoler dejenerasyon alanları	0,30±0,55 ^a	1,21±0,14 ^b	1,53±0,47 ^b	2,50±0,75 ^a	0,000

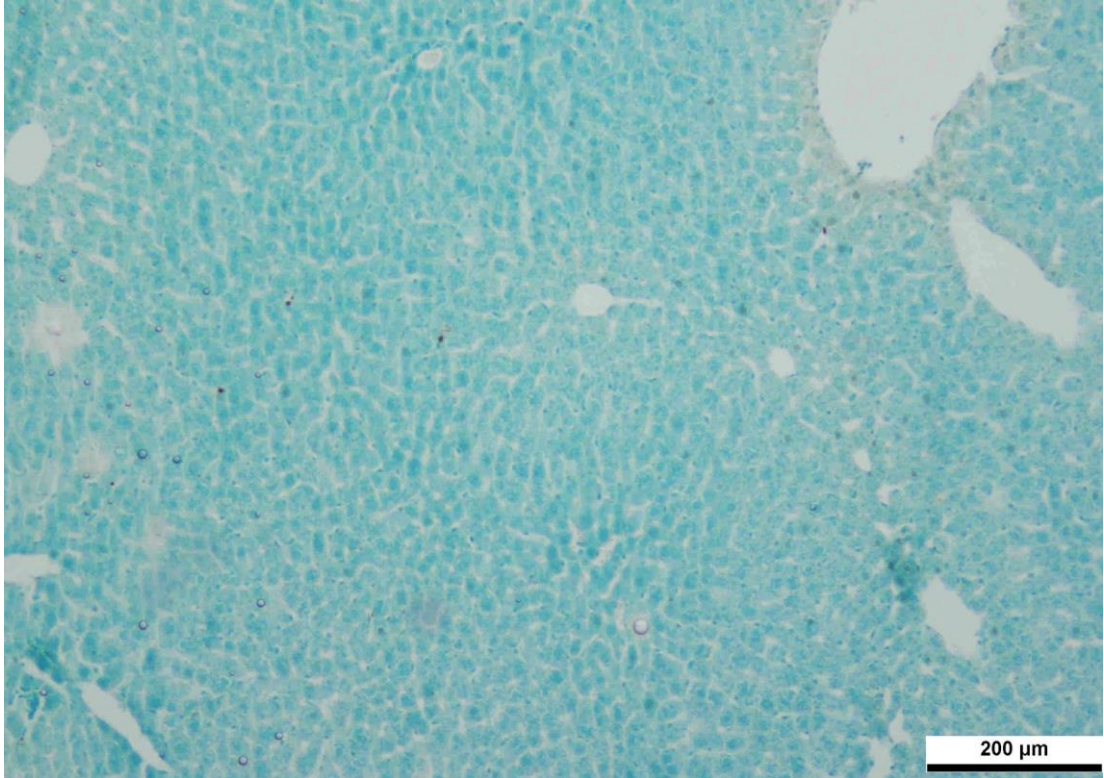
	Kortikomedüller bölgedeki damarlarda hiperemi	0,30±0,55 ^a	1,21±0,14 ^b	1,53±0,47 ^b	2,50±0,75 ^a	0,000
	Tubulus lumenlerindedökülmüş epitel hücrelerinin oluşturduğu yoğunluk	0,32±0,61 ^c	1,20±0,14 ^c	1,58±0,44 ^a	2,83±0,48 ^a	0,000
	Kortikomedüller bölgedeki damarlarda hiperemi	0,32±0,61 ^d	1,07±0,45 ^c	1,70±0,50 ^b	2,93±0,43 ^a	0,000
Testis	Testis TSK'da spermatogenetik hücrelerde veziküler görünüm	0,32±0,6 ^d	1,07±0,45 ^c	1,70±0,50 ^b	2,93±0,43 ^a	0,000
	TSK bazal membranındaki sertoli hücrelerinde dejenerasyon	0,32±0,61 ^c	1,25±0,16 ^b	1,70±0,52 ^b	2,93±0,43 ^a	0,000
	TSK lumeninde atrofikgörünüm	0,28±0,53 ^d	1,20±0,10 ^c	1,70±0,52 ^b	3,05±0,31 ^a	0,000
	İntersitisyel bölgedehyalinizasyon	0,28±0,53 ^d	1,20±0,10 ^c	1,87±0,50 ^b	3,05±0,31 ^a	0,000
	TSK'larda lumende dejenare olmuş germ hücre	0,28±0,53 ^d	1,22±0,08 ^c	1,90±0,53 ^b	3,05±0,31 ^a	0,000
Beyin	Fokalgia hücrelerdeinflamasyon	0,40±0,78 ^c	1,10±0,00 ^{bc}	1,33±0,73 ^{ab}	1,85±0,88 ^a	0,000
	Nöronlarda vakuolizasyonoluşumları	0,27±0,50 ^a	0,96±0,38 ^b	1,33±0,73 ^{ab}	1,72±0,74 ^a	0,000
	Beyinde Hiperemi	0,27±0,50 ^c	0,96±0,38 ^b	1,33±0,73 ^{ab}	1,85±0,46 ^a	0,000

3.6.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

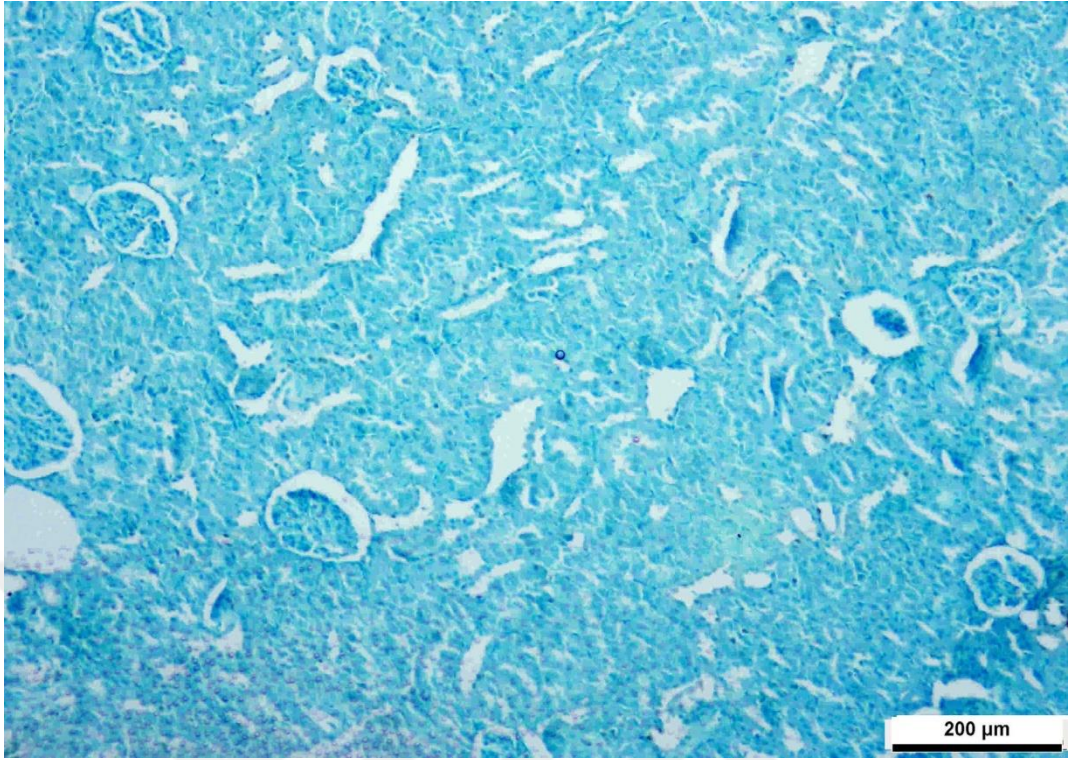
Yapılan çalışmada mikroskopik olarak incelenen karaciğer, böbrek ve testis dokularında apoptozisi belirlemek amacıyla yapılan TUNEL boyama yöntemi ile belirlenen immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistik verileri Çizelge 3.7’de detaylı olarak sunulmuştur.

3.6.3.1. Kontrol Grubu

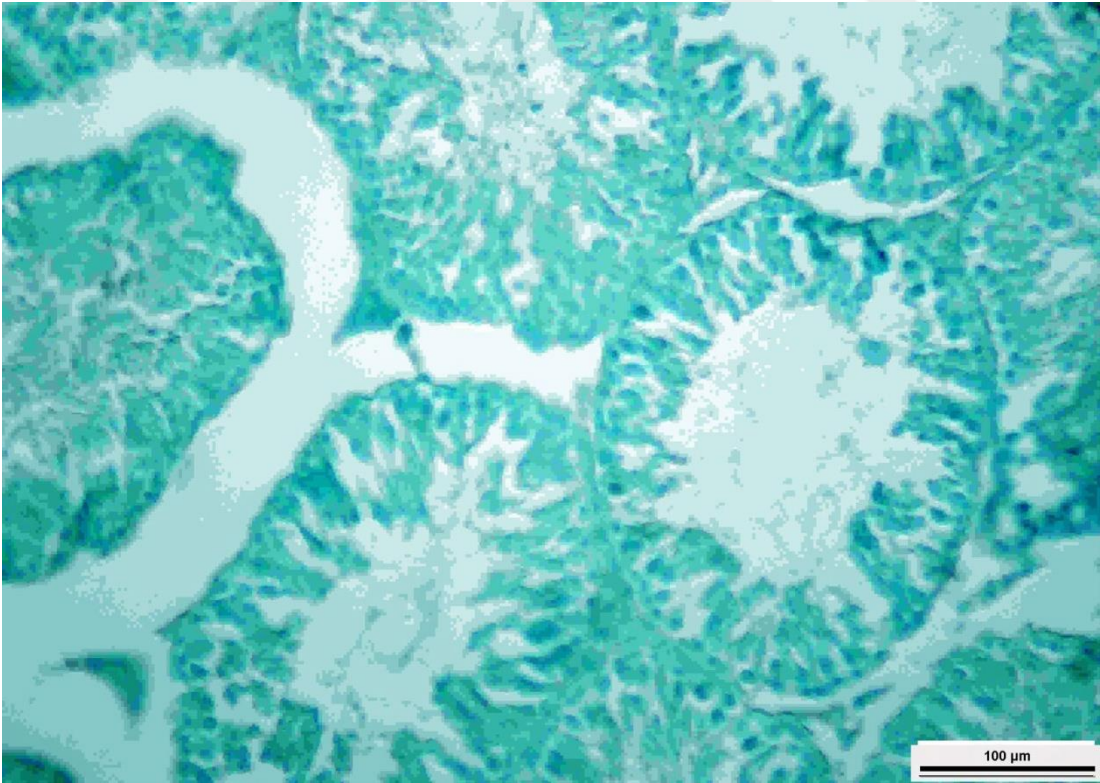
Kontrol grubunda bulunan ratların karaciğer (Resim 3.17.), böbrek (Resim 3.18.) ve testis (Resim 3.19.) dokularının kesitlerinde belirlenen TUNEL pozitif immün reaktivitesi saptanmadı.



Resim 3.17. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda TUNEL (-) hücreler. X10



Resim 3.18. Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL (-) hücreler. X10



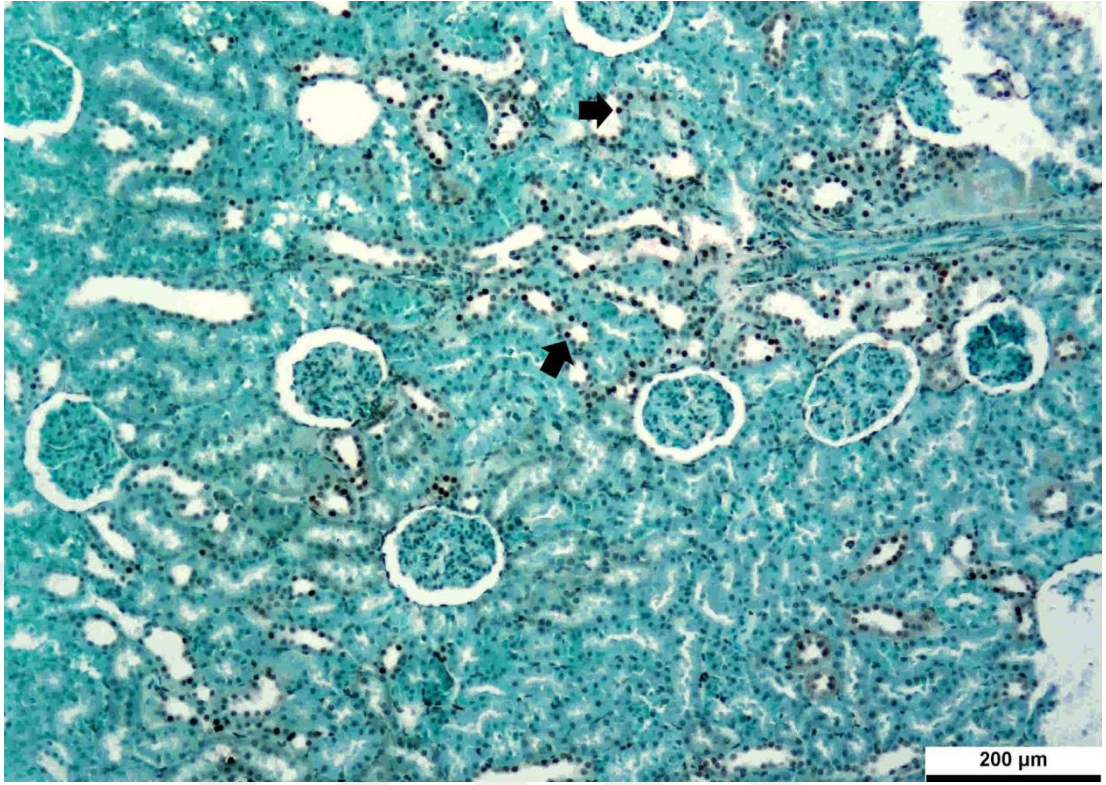
Resim 3.19. Kontrol grubuna ait testis dokusunda TUNEL (-) hücreler. X20

3.6.3.2. MTF₅₀ Grubu

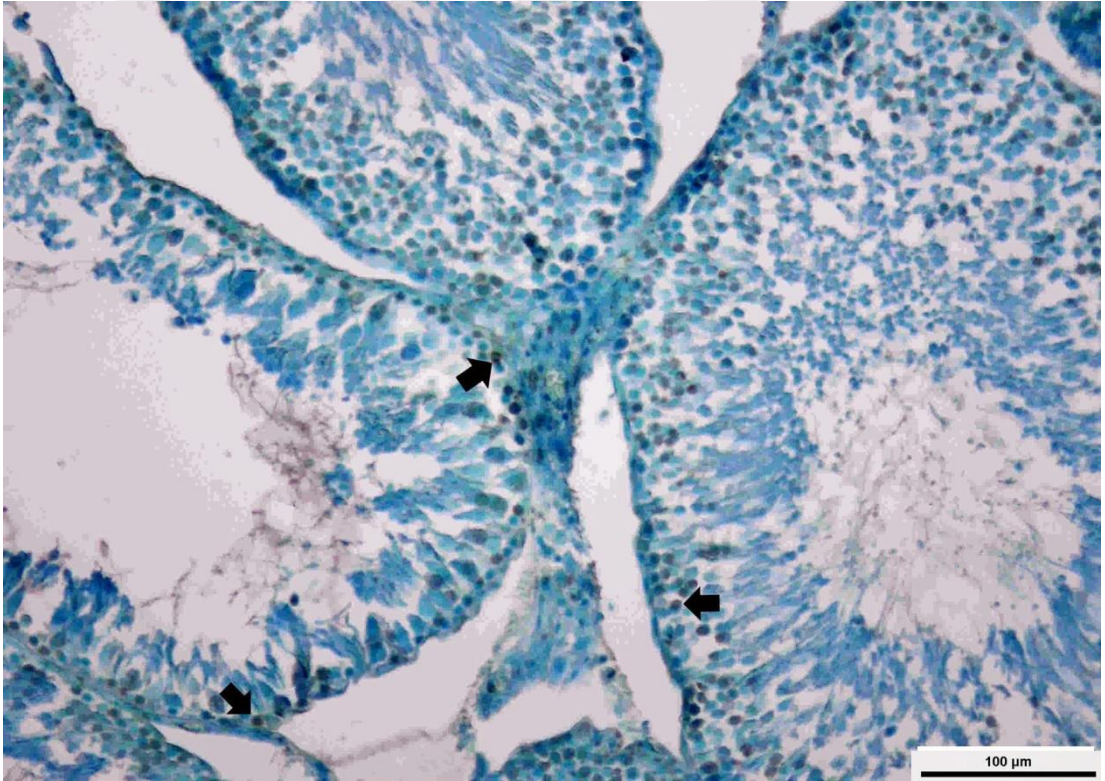
MTF₅₀ grubunda bulunan ratların karaciğerinde hepatositlerde TUNEL pozitif boyanma saptandı (Resim 3.20). Böbreklerde glomeruluslarda ve proksimal tubulus epitelinde TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.21). Testiste TSK'ların bazal membranına yerleşmiş olan spermatagonyumlarda ve intersitisyel bölge de Leydig hücrelerinde yine aynı şekilde yapılan yöntemle TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.22).



Resim 3.20. MTF₅₀ grubuna ait karaciğerde hepatosit çekirdeklerinde TUNEL (+) hücreler. X20



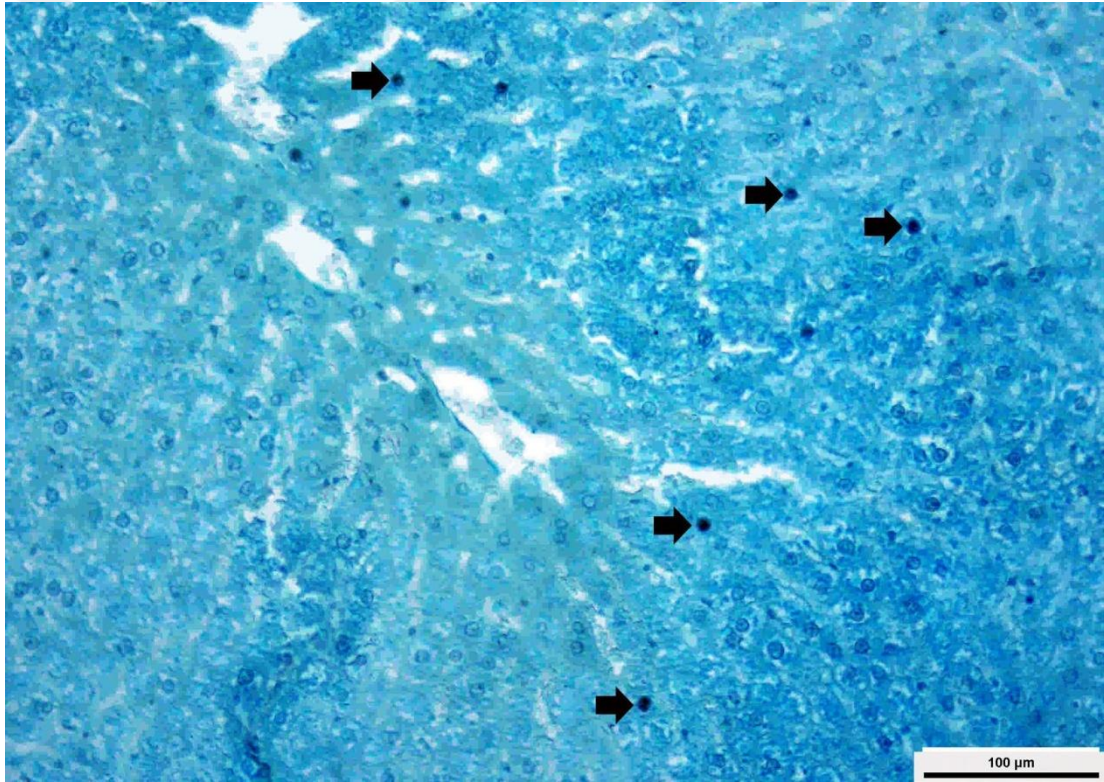
Resim 3.21. MTF₅₀ grubuna ait böbrek tubulus epitel hücrelerinde TUNEL (+) hücreler. X10



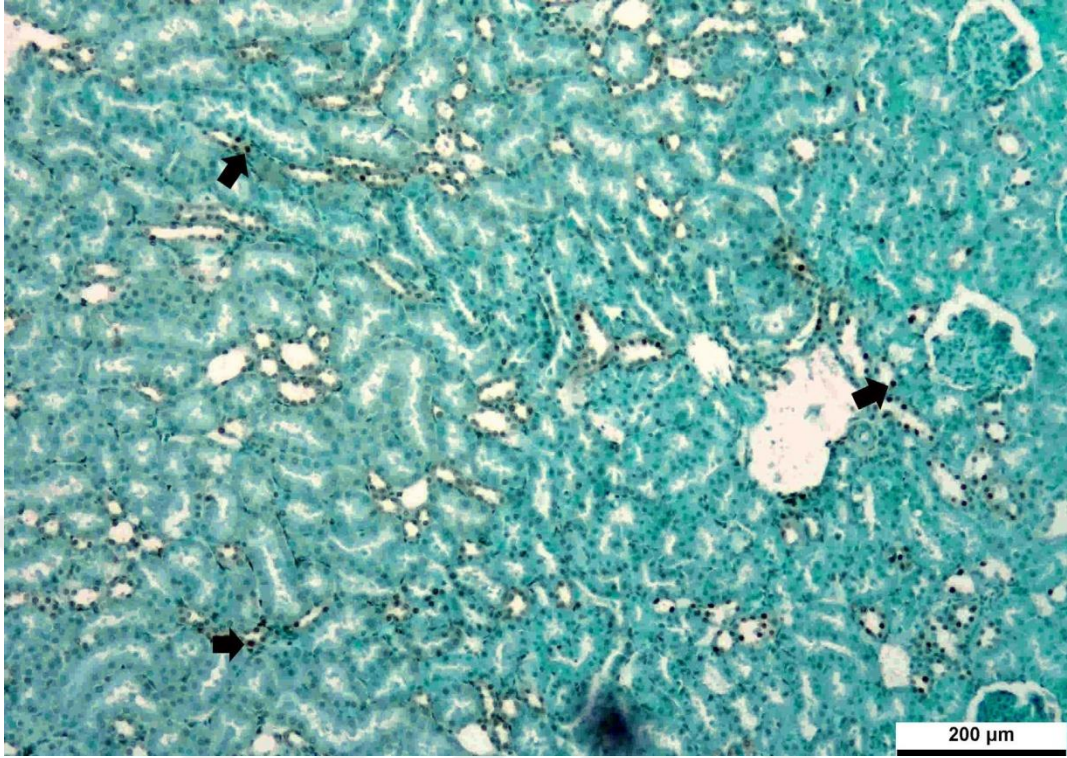
Resim 3.22. MTF₅₀ grubuna ait testis dokusunda TUNEL (+) hücreler. X20

3.6.3.3. MTF₁₀₀ Grubu

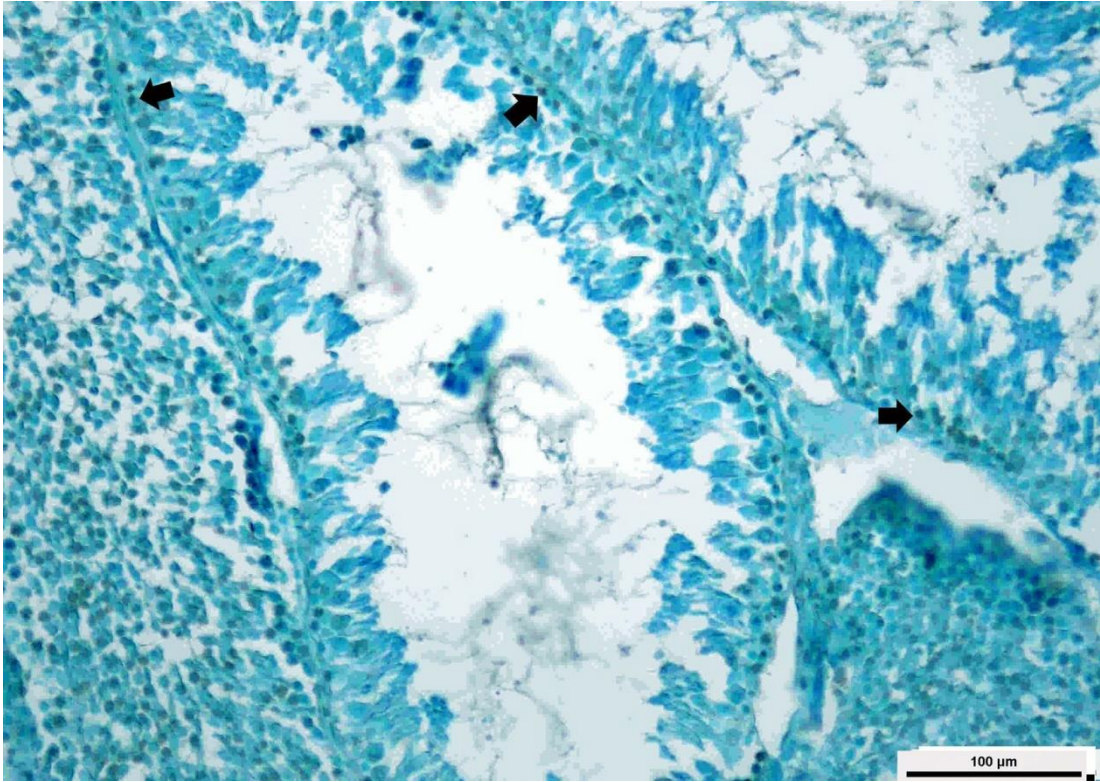
MTF₁₀₀ grubunda bulunan ratların karaciğerinde hepatositlerde TUNEL pozitif boyanma saptandı (Resim 3.23). Böbreklerde glomeruluslarda ve proksimal tubulus epitelinde TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.24). Testiste TSK'ların bazal membranına yerleşmiş olan spermatogonyumlarda ve intersitisyel bölge de Leydig hücrelerinde yine aynı şekilde yapılan yöntemle TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.25).



Resim 3.23. MTF₁₀₀ grubuna ait karaciğerde hepatosit çekirdeklerinde TUNEL (+) hücreler. X20



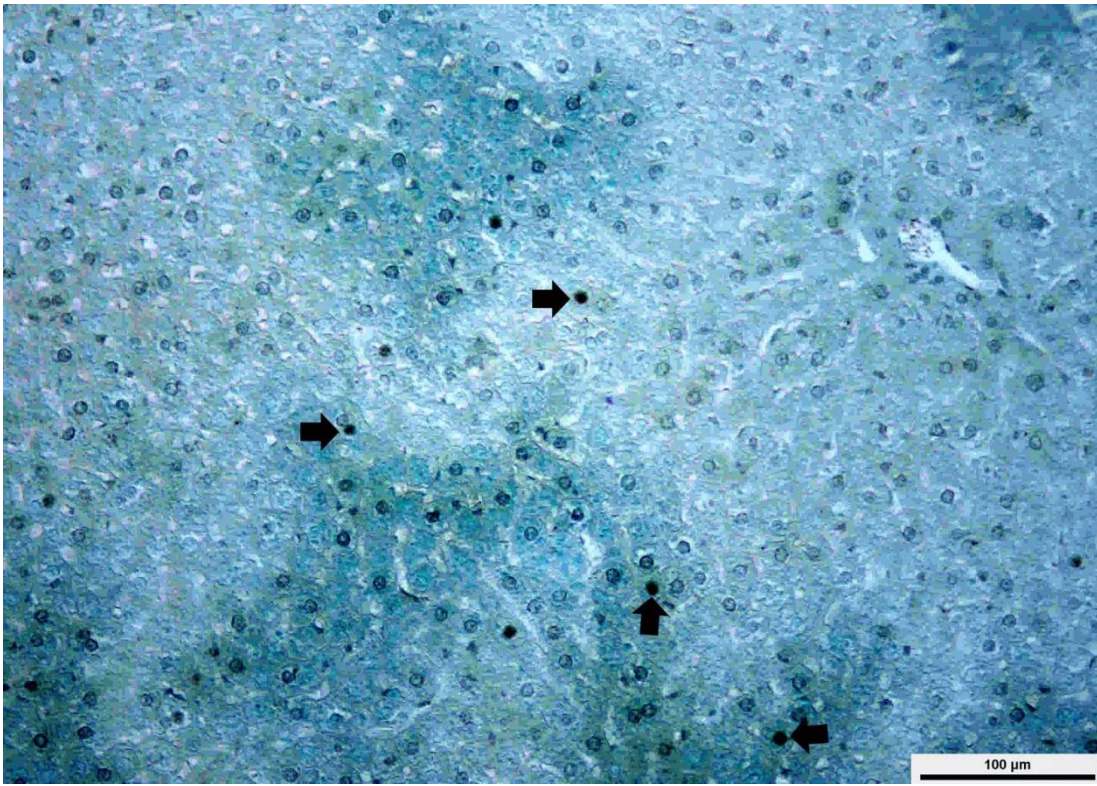
Resim 3.24. MTF₁₀₀ grubuna ait böbrek tubulus epitel hücrelerinde TUNEL (+) hücreler. X10



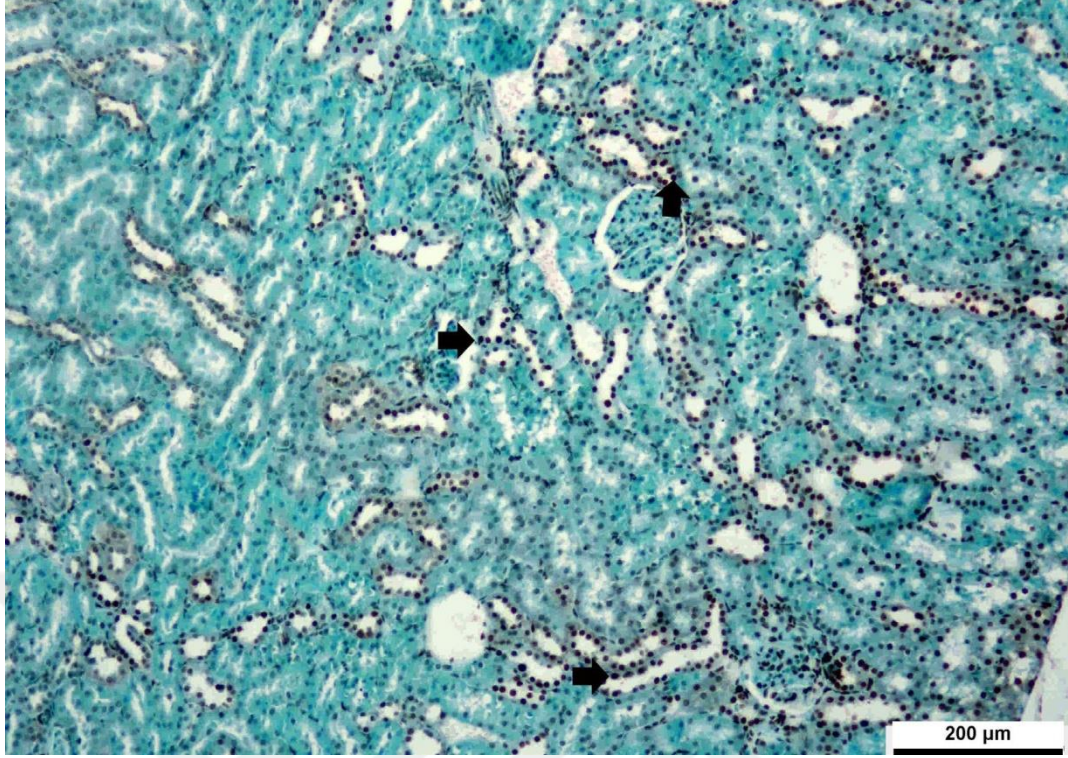
Resim 3.25. MTF₁₀₀ grubuna ait testis dokusunda TUNEL (+) hücreler. X20

3.6.3.4. MTF₂₀₀ Grubu

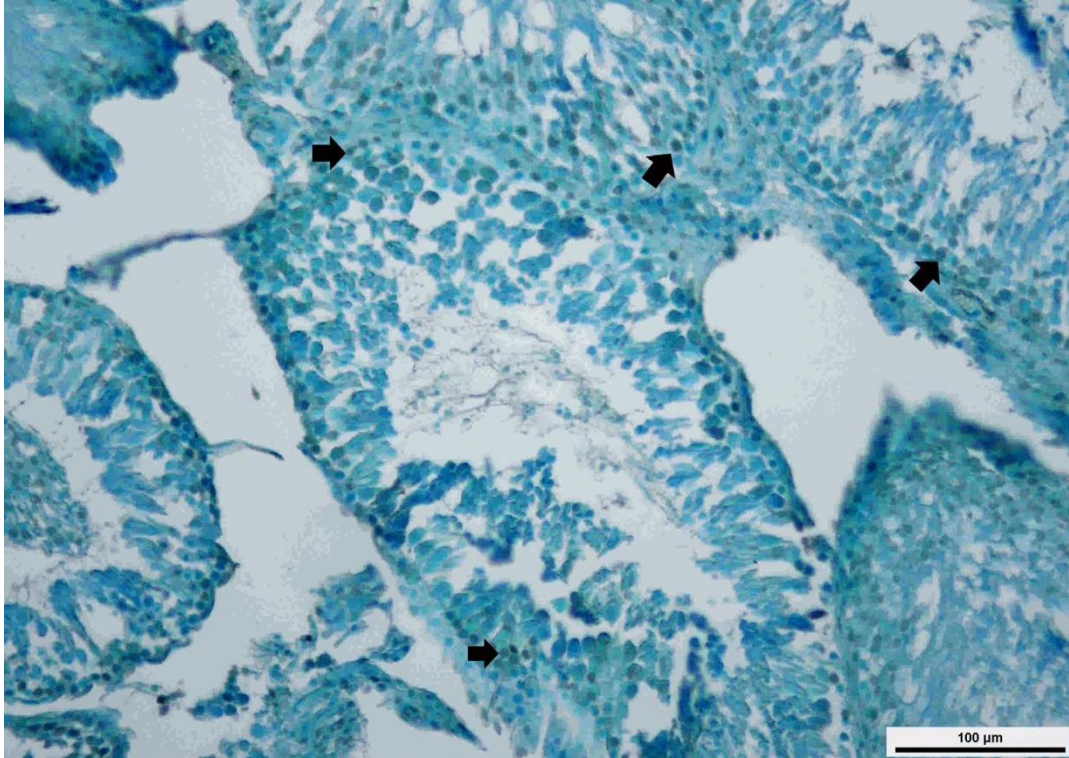
MTF₂₀₀ grubunda bulunan ratların karaciğerinde hepatositlerde TUNEL pozitif boyanma saptandı (Resim 3.26). Böbreklerde glomeruluslarda ve proksimal tubulus epitelinde TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.27). Testiste TSK'ların bazal membranına yerleşmiş olan spermatogonyumlarda ve intersitisyel bölge de Leydig hücrelerinde yine aynı şekilde yapılan yöntemle TUNEL pozitif boyanmalar tespit edildi (Resim 3.28).



Resim 3.26. MTF₂₀₀ grubuna ait karaciğerde hepatosit çekirdeklerinde TUNEL (+) hücreler. X20



Resim 3.27. MTF₂₀₀ grubuna ait böbrek tubulus epitel hücrelerinde TUNEL (+) hücreler. X10



Resim 3.28. MTF₂₀₀ grubuna ait testis dokusunda TUNEL (+) hücreler. X20

Çizelge 3.7. TUNEL boyama yöntemi ile karaciğer, böbrek ve beyin dokularında belirlenen immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistik verileri

Gruplar	Kontrol	MTF ₅₀	MTF ₁₀₀	MTF ₂₀₀	“P” DEĞERLERİ
Karaciğer IHC	0,27±0,50 ^c	1,10±0,00 ^b	0,82±0,50 ^b	1,60±0,53 ^a	0,000
Böbrek IHC	0,27±0,50 ^b	1,10±0,00 ^a	1,33±0,73 ^a	1,47±0,74 ^a	0,001
Testis IHC	0,27±0,50 ^b	1,10±0,00 ^a	1,22±0,35 ^a	1,47±0,74 ^a	0,000

4. TARTIŞMA

İyonlaştırıcı radyasyonlar, UV ışınları başta olmak üzere ağır metaller ve insektisitler gibi kimyasal ajanlar canlılar üzerinde birçok olumsuz etki oluşturdukları bilinmektedir (Pizzino vd.,2017; Ercal vd.,2001). Kimyasal ajanlar doku ve organ hasarları başta olmak üzere kanser gibi pekçok hastalığın şekillenme aşanmasından sorumlu tutulmaktadır. Bu ajanlar canlılar üzerinde reaktif oksijen türlerinin birikimini artırarak oksidatif stresin oluşmasına sebep oldukları bilinmektedir (Toyokuni vd., 1995; Reuter vd., 2010; Klaunig., 2018; Hayes vd., 2020).

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte tarımda pestisitlerin kullanım oranlarında da artış görülmektedir. Bu kimyasal kirleticilerinin kullanımın gün geçtikçe artmasıyla beraber pestisit kalıntısı bulaşmış su ve yiyeceklerin canlılar tarafından tüketilmesi sonucunda olumsuz etkiler meydana gelmektedir. Pestisitlerin sadece hedef canlılar üzerinde toksik etkiye sahip olmadığı diğer canlılar tarafından bu maddelere maruz kalınması sonucunda da şiddetli akut veya kronik metabolizma bozukluklarına bağlı hastalıklar ve ölüm gibi kaçınılmaz sonların ortaya çıktığı bilinmektedir (Shadnia ve vd.,2005).

Oksidatif stres, oksidasyon ve antioksidatif etkinin oksidasyon lehine olduğu durumlarda ortaya çıkar. Genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) değişiklikleri organizmaların fizyolojisini, büyümesini ve hayatta kalmasını etkilemektedir (Liguori vd., 2018). Bu nedenle, oksidatif stresi belirlemede etkili bir yöntem olarak antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki değişimi ölçmekten oluşmaktadır (Liguori vd., 2018; Pisoschi vd., 2021). Antioksidan enzim aktivitesinin göstergelerinden bir tanesi de süperoksit dismutazdır (SOD). Serbest oksijen radikallerini süpüren ve bundan dolayı metabolizma da miktarı azalan bir enzim olarak karşımıza çıkan SOD, genellikle oksidatif stres kaynaklarının bir sinyali olarak kabul edilmektedir (Hu vd., 2019 ; Culotta.,2001;Younus., 2018). Katalaz (CAT) ise hemen hemen tüm biyolojikorganizmalarda bulunan antioksidan savunma sistemindeki diğer bir anahtar enzim olarak karşımıza çıkmaktadır (Nandi vd.,2019 ; Chen vd., 2004).

Oksidatif stres aynı zamanda antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır (Sies,2018). Oksidatif dengenin bozulması sonucu artan ROS miktarı hücre çeperinde hasar meydana getirmekte; bunun sonucunda da hücre içi proteinlerin yapı ve işlevlerinde görülen bozukluklar, kalıtsal materyal olan DNA'da yapısal hasarların meydana gelmesine sebep olmaktadır (Özcan vd., 2015;Abolaji vd.,2018). Artan ROS türlerinin yetersiz detoksifiye olması sonucunda organizma da farklı bölgelerde oksidatif hasarın oluşmasına neden olmaktadır (Salim,2017).

Yeni keşfedilen semikarbazon insektisit grubundan bir tanesi olan Metaflumizon (MTF)'un, kimyasal olarak farklılaştırıldığı pirazolinler başta olmak üzere genelinde böcekler üzerinde Na^+ kanalı bloğu oluşturarak diğerleri gibi aynı etki mekanizmasına sahip bir SCBI olduğunu doğrulamaktadır. MTF, hayvan sağlığı alanında bu etki şekline sahip olduğu bilinen ilk üründür. Aynı zamanda pirazolinlerin temelini oluşturduğu, ancak kimyasal olarak MTF'den çok daha farklı olan Indoxacarb, bu etki şekline sahip diğer kayıtlı bir insektisit olarak bilinmektedir. Indoxacarb öncelikle lepidoptera türü adı verilen zararlılara karşı kullanılmakta olup; aynı zamanda birçok bitki böceği, yaprak kurdu, pire, bit, böcek, sinek, hamamböceği ve karınca türleriyle de mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır (Takagi vd.,2007; Wang vd., 2020).

MTF, BASF tarafından geliştirilen tarımda verimi arttırmak ya da böceklerle mücadele de kullanılmak amacıyla yeni bir insektisit türü olarak kullanım alanına girmiştir. MTF'ye subkronik oral veya dermal maruz kalma sonucunda düşük toksisiteye sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Hempel vd.,2007).

Reaktif oksijen türlerinin başlıca hedefi hücre membranının temel bileşeni olan lipid molekülleridir. ROS doymamış yağ asitleri zincirinden hidrojeni uzaklaştırarak lipid peroksidasyonunu meydana getirmektedir. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyeleri ise ortaya çıkan oksidatif hasarın belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak değerlendirilmektedir (Patlolla vd., 2009; Cherian vd.,2019).

MTF yeni keşfedilen bir insektisit olmakla beraber canlılar üzerinde düşük toksisiteye sahip olduğu da yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Hempel vd.,2007). Bunun yanı sıra gözde veya ciltte tahriş edici ve cildin hassasiyetini arttırma potansiyeline sahip olmadığı da yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Buna rağmen direkt maruziyetlerden birisi olan ağız yoluyla alınması sonrasında organizmada doku ve kan örnekleri üzerinde oluşturabileceği hasarlar konusunda araştırmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bu tez çalışmasında erkek sıçanlarda MTF'nin ağızdan intragastrik yöntemle farklı dozlarda (50,100 ve 200 mg/kg) uygulanmasının kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında muhtemel oluşturduğu hasarın yapısal, biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

MTF, indoxacarb ile aynı hedef bölgeyi paylaşmasına rağmen, bu bölgede bilinen bir hedef bölge direnci bulunmamaktadır. İndoksakarba karşı metabolizma da oluşan direnç yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Shono vd., 2004), ancak bunun yapısal farklılıklar oluşturulması sebebiyle MTF'ye çapraz direnç göstermesi beklenmeyen bir durumdur. Behm ve ark., 2004'de Spodoptera litura suşu üzerinde yapmış olduğu bir çalışma göstermiştir ki indoxacarb adı verilen kimyasala dirençli iken MTF'ye karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Salgado ve Hayashi., 2007). Ayrıca, imidakloprid, karbamatlar, organofosfatlar ve avermektinlere dirençli böcek suşları, metaflumizona karşı çapraz direnç gösterdiği de yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Cutler vd., 2006).

Sprague-Dawley ratlarda metaflumizona akut olarak ağızdan maruz kalınması durumunda oluşabilen toksisiteye yönelik yapılan bir çalışma da; saflık yüzdesi %96,3 olan MTF'ye 5000 mg/kg dozunda 14 gün boyunca intragastrik gavaj yoluyla uygulanması sonucunda LD₅₀ dozunun erkek ve dişi ratlar da belirlenen 5000 mg/kg 'dan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan diğer bir çalışma da CD-1 fareler üzerinde yine ağızdan intragastrik gavaj yoluyla uygulanan MTF'nin LD₅₀ dozu olan 5000 mg/kg'a maruz kalan hayvanlarda herhangi bir klinik, makroskopik ve histopatolojik bulguya rastlanılmadığı ve LD₅₀ dozunun 5000 mg/kg'dan daha fazla olabileceği tespit edilmiştir (Hempel vd., 2007; World Health Organization.,2009).

Dişi ve erkek CD-1 farelerde yapılan başka bir çalışmada ise 28 gün boyunca farelere diyetle 50, 200 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarda MTF uygulamasının yapıldığı ve günlük alınan doz miktarlarının 10, 42 ve 101 mg/kg olduğu bildirilmiştir. İkinci haftanın sonunda 800 mg/kg grubuna ait dişi ve erkek farelerden 8 tanesinin öldüğü açıklanmıştır. Çalışma sonucunda 800 mg/kg grubundaki farelerin vücut ağırlıklarında azalma gözlemlendiği, 200 ve 800 mg/kg doz aralığında MTF verilmiş farelerde ise dalakta atrofi ve yumurtalıklarda ise folikül gelişiminde gecikme gibi histopatolojik değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (World Health Organization.,2009).

Yapılan bu tez çalışmasında uygulanan dozların belirlenmesi aşamasında (Hempel vd., 2007) LD₅₀ (5000 mg/kg) dozunun 1/5'i 1000 mg/kg, 1/10'u 500 mg/kg, 1/20'si 250 mg/kg ve 1/40'ı 125 mg/kg olan doz miktarı belirlenmiş ve uygulama sonrası hayvanlar 24 saat takip edilmiştir. MTF'ye maruziyet aşamasından 24 saat sonrasında en yüksek doz miktarı olan 1000 mg/kg'a maruz kalma sonucunda; uygulama yapılmış gruptaki 8 rat'ın 4'ünde felç ve sinirsel klinik belirtilerin görülmesinden 1-2 saat sonra öldükleri belirlendi. Bu doğrultu da doz hesaplaması tekrar yapılmış ve yeni uygulama grupları belirlenmiştir. Yeni belirlenen MTF grupları Afyon Kocatepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan olur yazısı alındıktan sonra yeni uygulama grupları olan 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg olacak şekilde doz ayarlaması yapılarak uygulamaya 28 gün boyunca devam edilmiştir.

Sprague Dawley ratlarda yapılan bir çalışmada 28 gün boyunca MTF'nin 100, 500 ve 1000 mg/kg dozlarında ağızdan intragastrik gavaj yoluyla uygulama sonrasında 100 mg/kg doz uygulanmış olan gruptaki ratlarda histopatolojik bulgulara herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. 500 ve 1000 mg/kg doz grubunda ki ratlarda total eritrosit ve hemoglobin seviyelerinde azalmaların görüldüğü; ayrıca histopatolojik incelemeler sonucunda dalak dokularında ekstramedüller hematopoiez meydana geldiği bildirilmiştir (World Health Organization.,2009).

Sprague-Dawley erkek ve dişi ratlarda 90 gün ağızdan intragastrik gavaj yöntemiyle 30, 60 ve 300 mg/kg dozunda MTF'ye subkronik olarak maruz bırakıldığı bildirilmiştir. Doksanıncı günün sonunda sıçanlarda klinik görünüm olarak yem tüketiminin azalmasına bağlı vücut ağırlıklarının azaldığı belirlenmiş, 300 mg/kg

dozunda MTF'ye maruz bırakılan gruptaki sıçanların karaciğer dokularında hafif lezyonların görüldüğü belirlendiği açıklanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda MTF'ye 90 gün boyunca ağız yoluyla intragastrik gavaj yöntemiyle uygulanması sonucunda fazla bir yan etkinin gözlenmediği belirlenmiştir. Bu dozlardan (NOAEL) erkek ratlarda 300 mg/kg, dişi ratlarda 200 mg/kg aralığında çok fazla bir yan etkinin oluşmadığı ifade edilmiştir (World Health Organization.,2009).

Yapılan başka bir çalışmada da diyetle 28 gün boyunca erkek ve dişi ratlara farklı dozlarda MTF (250, 1000, 5000 ve 10000 ppm) uygulaması ile erkeklerin 27.2, 86.4, 418 ve 798 mg/kg ve dişilerin 23.8, 83.2, 361 ve 890 mg/kg dozlarda MTF'ye maruz bırakılması sonrası tüm gruplarda klinik olarak yiyecek tüketimi ile beraber vücut ağırlıklarında da azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma da dişi ratlarda kontrol grubuna göre MTF uygulanan grubun yumurtalık ve uterus ağırlıklarında da azalma meydana geldiği açıklanmıştır (World Health Organization.,2009).Ayrıca, Wistar albino ratlarda akut maruziyet sonucunda tek doz ağızdan intragastrik gavaj yöntemiyle 0, 125, 500 ve 2000 mg/kg doz seviyelerinde MTF uygulamasının genel toksisite ve nörotoksositeye yol açmadığı bildirilmiştir (World Health Organization.,2009).Ancak buna rağmen yapılan diğer bir çalışmada 1, 12, 36 ve 150 mg/kg MTF'nin ağızdan intragastrik gavaj yöntemiyle 90 gün boyunca Wistar albino ratlara uygulanması sonucunda klinik olarak toksisite belirtileri gözlenen doz miktarlarının erkek ratlarda 300 mg/kg, dişi ratlarda ise 150 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu hayvanlarda vücut ağırlığında, yiyecek ve içecek tüketimindeki azalmaların da olduğu; fakat bu kullanılan dozlarda nörotoksik veya genel toksik bir etkisinin olmadığı da belirlenmiştir (World Health Organization.,2009).

Rat ve tavşanlarda MTF'nin genital sistem üzerine yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre ratlarda 30 mg/kg ve tavşanlarda 25 mg/kg günlük alınan doz seviyelerinde teratojenik bir etki göstermediği de belirtilmiştir. Diğer hayvan türlerindeki etkilerine yönelik yapılan bir çalışmada Beags cinsi köpeklerde 5 erkek ve 5 dişi köpeğe jelatin kapsüller aracılığıyla 30, 40 ve 60 mg/kg dozlarda 12 ay boyunca MTF uygulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Fakat 60 mg/kg dozunda uygulanan MTF bu cins köpeklerde klinik tablonun kötüleşmesi sebebiyle bu doz

seviyesinin yerine çalışma grubuna 40 mg/kg olarak devam edilmiştir. Deneysel aşama sonrasında artan doza bağlı olarak hayvanlarda dalak ve karaciğer ağırlıklarının azaldığı ve kan parametlerinden bazıları olan hemoglobin, MCHC ile total bilirubin seviyelerinde düşüşlerin olduğu bildirilmiştir. Yapılan aynı çalışmanın erkek hayvanlarında böbreklerin tübül epitellerinde daha fazla derecede olmak üzere pigment oluşumu görüldüğü bildirilmiştir. Aynı şekilde dişi hayvanlarda ise bu etkinin erkeklere göre daha az miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda yapılan histopatolojik incelemeler ışığında Kupffer hücreleri sayısında az miktarda artış olduğu ve dalakta da histopatolojik bir değişikliğin şekillenmediği bildirilmiştir (World Health Organization.,2009). Bu yapılan çalışmaların yanı sıra MTF'un in vitro etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, MTF (156.3-5000 µg/ml) 4 saat boyunca memeli hücresi olan Çin hamsteri V79 hücre hattına uygulanması yapılmış ve HPRT lokusunun mutasyonunu değerlendirilmesi sonucunda MTF memeli hücrelerinde ileri derecede mutasyonlar şekillendirmediği belirlenmiştir (World Health Organization.,2009).

Yapılan bir diğer çalışmada da CD-1 erkek ve dişi farelere 28 gün boyunca 10, 20 ve 40 ppm konsantrasyonlarında MTF uygulaması yapılmış ve günlük alınan dozların 2, 4.3 ve 8.2 mg/kg aralığında olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda 40 ppm doz grubundaki farelerde vücut ağırlıklarında azalma ve gıda tüketiminde istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşüşlerin tespit edildiği; ayrıca dokularda histopatolojik değişikliklerin gözlemlenmediği bildirilmiştir. Farelerde yan etki göstermeyen dozun (NOAEL) 40 ppm yani 8.2 mg/kg olduğu ifade edilmiştir (World Health Organization.,2009). İn vitro ve in vivo mutajenite testlerinde MTF'nin potansiyel genotoksik kimyasal ajan olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ratlarda ve farelerde uzun süreli toksisite çalışmalarında potansiyel kanser yapıcı etki gösterdiği de bildirilmiştir (Hempel vd., 2007). Sunulan bu tez çalışmasında da haftalara göre canlı ağırlık değişimleri incelendiğinde MTF₅₀, MTF₁₀₀, MTF₂₀₀ gruplarında MTF'nin artan dozlarına bağlı olarak canlı ağırlık değişimlerinde de azalmaların görüldüğü ve kontrol grubu ile farklılık oluşturduğu belirlenmiştir.

Birçok kimyasal başta olmak üzere çeşitli zararlı moleküllere metabolizmanın maruz kalması sonrası detoksifikasyon işlemi karaciğer de gerçekleşmektedir. Bu yüzden

karaciğer enzim aktiviteleri üzerindeki değişiklikler değerlendirildiğinde üre, glikoz, total protein, kreatinin, AST, ALT ve ALP gibi bazı ölçüm seviyelerinde değişiklikler oluşturduğu bilinmektedir (Yılmaz vd., 2017; Milošević vd.,2018).

Yapılan bir başka çalışmada malatyonun biyokimyasal ve histopatolojik yönden verebileceği muhtemel zararların araştırılması incelendiğinde, 14 gün boyunca 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak uygulama yapılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen verilerden karaciğer enzimlerinin serum düzeyleri değerlendirildiğinde (AST, ALT, ALP) kontrol grubuna göre malatyon grubunda artış gösterdiği belirtilmiştir (Raoofi vd.,2016). Abdel-Daim ve ark., ratlar üzerinde malatyon kaynaklı toksisiteyi araştırdıkları çalışma da 30 gün süre ile her gün 200 mg/kg doz olacak şekilde gavaj yoluyla uygulamışlardır. Çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde malatyon uygulamasının üre, kreatinin artmasına karşın total protein aktivitelerinde azalış meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmamız da MTF'nin 50, 100, 200 mg/kg doz aralığında ratlara uygulanmasının AST, ALT, ALP, üre, kreatinin, total protein ve glikoz düzeylerinde artışa neden olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTF gruplarının anlamlı şekilde farklılıklar oluşturduğu belirlendi. Bu elde ettiğimiz sonuçlar MTF'nin artan dozlarına bağlı olarak karaciğer ve böbrek hasarını arttırdığı ve buna bağlı olarak karaciğer ve böbrek dokularında toksik etkisini güçlendirdiğini göstermiştir.

Karimani ve ark., erkek ratlarda subkronik diazinon uygulamasının biyokimyasal parametrelerde ve oksidatif stresin doku belirteçlerindeki etkilerini araştırdıkları çalışma da; 7 hafta boyunca her gün 10 mg/kg dozlarda maruz bırakılmıştır. 7. haftanın sonunda DZN'ye maruz kalmanın ardından kalp, böbrek, karaciğer, beyin ve testiste MDA seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir ($p<0.01$). Sunulan bu tez çalışmasında da lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyeleri tam kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında değerlendirildiğinde artan dozlar da (50, 100, 200 mg/kg) MTF uygulamasının MDA seviyelerini anlamlı derecede ($p<0,05$) arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca artan MDA seviyeleri MTF'nin oksidatif stres oluşumuna neden olduğunu ve oluşan bu stres sonucunda da lipid peroksidasyonunu yükselttiği tespit edilmiştir.

Organofosfat insektisit türlerinden biri olan Malathion'nun ratlarda kan ve doku örnekleri üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışma 28 gün boyunca 100 mg/kg doz da intragastrik gavaj yoluyla her gün uygulamışlardır. 28.gün sonunda tam kan örneklerinde, karaciğer, böbrek, beyin ve kalp dokularında GSH seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (Akbel vd., 2018). Yapılmış olan bu tez çalışmasında MTF'nin farklı dozlarına (50, 100, 200 mg/kg) maruz kalma sonucunda antioksidan enzim seviyelerindeki farklılıklar değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre artan oranlardaki MTF uygulanan sıçanların kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularında GSH seviyelerinin azalttığı belirlenmiştir.

Ratlarda diazinon (DZN) kaynaklı hemato-biyokimyasal değişiklikler ve oksidatif stres üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışma da 4 hafta boyunca 20 mg/kg doz da DZN intraperitonel olarak uygulaması sonucunda karaciğer, böbrek ve kalp dokularının SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde azalmalara yol açtığı belirlenmiştir (Abdel-Daim vd.,2018). Benzer şekilde yapılan bu tez çalışmasında da artan dozlarda MTF'a maruz kalan grupların eritrosit örneklerinde, karaciğer, böbrek ,beyin ve testis dokularında kontrol grubuna kıyasla SOD ve CAT seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir.

Hassan ve ark., 21 günlük ratlarda yaptıkları bir çalışmada haftada 3 kez 100 mg/kg dozda ağız yoluyla intragastik gavajla indoxacarb toksisitesine maruz bırakılması sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde; SOD seviyelerinde artışa neden olduğu, kontrol grubuna kıyasla Indoxacarb grubu karaciğer dokularının histopatolojik olarak incelenmesinde birden fazla büyük boyutlu vakuole sahip sitoplazma görünümünün oluştuğu ve yağlı dejeneratif değişiklikler ile nekrotik bulgulara rastlandığı; ayrıca hepatositlerde geniş alanlara yayılmış karaciğer lobiler yapısının kaybolduğu ve buna ilaveten yangısal reaksiyonların görüldüğü bildirilmiştir. Böbrek dokusunda ise glomerulus ve tubulus epitel hücrelerinde dejeneratif ve nektorik değişiklikler ile şiddetli hasarların oluştuğu parankim ve vakuoler dejenerasyonlara rastlandığı; bunun yanı sıra yangısal hücre reaksiyonlarında oluştuğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan diğer bir çalışmada ratlarda malatyon toksisitesi oluşturulmuş ve bu çalışmada karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki histopatolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu

Çalışma da 28 gün boyunca ratlara 100 mg/kg günlük doz miktarın da malatyona ağızdan gastrik gavaj yoluyla maruz bırakılmış ve sonucunda da karaciğerde sinüzoidal dilatasyon, hepatositlerde dejeneratif değişiklikler ile sinüzoidal dilatasyon alanlarına, beyinde fokal glia hücre infiltrasyonları ile nöron dejenerasyonuna ve böbrekte de Bowman kapsülünün daralması gibi histopatolojik bulguların tespit edildiği bildirilmiştir (Akbel vd.,2018).

Yapılan bu çalışmalara benzer şekilde de sunulan tez çalışmasının sonuçları histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre MTF₅₀ grubunda karaciğer dokusunda vena centralislerde hiperemi ve hepatositlerinde dejeneratif değişiklikler, çift çekirdekli hepatosit oluşumları, periportal bölgede safra kanal hiperplazisi ile kupffer hücre oluşumlarının görüldüğü belirlendi, böbrek örneklerinde de glomerulusların bowman boşluğunda genişleme ve kapiller yumağında vakuolizasyon oluşumları belirlenmiştir. Buna ek olarak Tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon alanları ile kortikomedullar bölgede hiperemi, tubulus lumenlerinde dökülmüş epitel hücrelerinin oluşturduğu yoğunlaşmış kitleye rastlanmıştır. Beyin dokusu incelendiğinde de nöronlarda vakolizasyon, hiperemi ve fokal glia hücre infiltrasyon alanlarının oluştuğu gözlemlendi. Artan dozlarda MTF uygulamasının karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oluşan histopatolojik bulguları da şiddetlendirdiği belirlendi.

Tarım alanlarında kullanılan insektisitlerden biri olan diazinonun testis dokusuna olan etkilerinin histokimyasal araştırılması amaçlanan bir çalışma da Wistar albino cinsi yetişkin erkek ratlara LD₅₀ dozunun (1250 mg/kg) 1/10, 1/20, 1/40 ve 1/80'i serum fizyolojikle eritilerek gavajla ağız yoluyla toplam da 8 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda testis dokusunda ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde, diazinonun verilme süresine bağlı olarak değişiklik gösteren dejeneratif bulgulara rastlandı.

Diazinon'un 1 günlük uygulandığı grupta, kontrol grubuna benzer şekilde normal görünümlü seminifer tübüllerin yanında atrofi oluşmaya başlamış TSK'ların da olduğu belirtilmiştir. Diazinon'un 2 gün boyunca verildiği grupta ise seminifer tübül epitel çapında küçülme, germinal epitelde yapısal bozukluk, spermatozoon oluşumunda azalmanın görüldüğü ifade edilmiştir. Aynı şekilde bazı TSK'larda da

atrofinin tespit edildiği ifade edilmiştir. Ratlarda Diazinon'un 4 ve 8 günlük uygulamasını takiben incelenen testis dokularında seminifer tübüllerde yapısal bozukluk, germinal epitelde incelme ve lümende dejenere olmuş germ hücrelerinin oluşturduğu kitleye rastlandığı ifade edildi. Benzer şekilde yapılmış olan bu çalışma da apoptotik hücre oranları açısından gruplar incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılığın saptandığı ifade edilmiştir. 2 günlük grubun apoptotik hücre ortalaması diğerlerine göre daha yüksek bulundu. Kontrol grubu ile bütün gruplar arasında farkın anlamlı bulunduğu belirtilmiştir. Diazinonun LD50 dozunun 1/10, 1/20, 1/40 ve 1/80'inin uygulandığı sıçanların bu testis dokularında spermatozoon üretiminin azaldığı, apoptotik hücrelerin çoğaldığı ve bunların da spermatogenezi engelleyerek infertiliteye yol açabileceği sonucunda varıldığı ifade edilmiştir. Sunulan bu tez çalışmasında da testis dokularında TSK'da spermatojenik hücrelerde veziküler görünüm, sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, TSK lumeninde atrofik bir görünüm, intersiyel bölgede hiyalinizasyon oluşumları ile birlikte yine TSK'ların lumeninde dejenere olmuş germ hücrelerinin oluşturduğu yoğunlaşmış kitleye rastlanıldı. Mikroskopik olarak tespit edilen bu bulgular MTF'nin artan dozlarına bağlı olarak da şiddetinin yükseldiği belirlendi ve kontrol grubu ile anlamlı farklılık olduğu tespit edildi. Aynı şekilde yapılan çalışma da MTF verilen gruplar da kontrol grubuna kıyasla apoptozisin anlamlı olarak arttığı bulundu. Çalışmamızda MTF'nin artan dozlarına bağlı olarak karaciğer, böbrek ve testis dokularında TUNEL (+) hücre sayısının da artış gösterdiği belirlendi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması Metaflumizon'un LD₅₀'sinin (5000 mg/kg) 1/25'i (200 mg/kg), 1/50'si (100 mg/kg) ve 1/100 (50 mg/kg)'nün ratlara oral gavaj yöntemiyle 28 gün boyunca verilerek metabolizma da oluşan oksidatif stresin biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması yönüyle orijinal bir çalışma konumundadır. Bu açıdan çalışmamız literatürde ki boşluğu dolduracak niteliktedir.

MTF₅₀, MTF₁₀₀ ve MTF₂₀₀ gruplarında MDA, SOD, CAT düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği, GSH gibi vücudun enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin azalttığı belirlenmiştir.

MTF₅₀, MTF₁₀₀ ve MTF₂₀₀ gruplarında AST, ALT, ALP, üre, kreatinin, total protein, glikoz düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir.

MTF₅₀, MTF₁₀₀ ve MTF₂₀₀ gruplarında karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokularında hasara ilişkin histopatolojik değişiklikler ile hücre ölümünü gösteren apoptotik bulguların oluştuğu belirlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında yapılan çalışmamız da Metaflumizon'un etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi için farklı yöntemler ile desteklenmesi ve koruyucu tedbirlerin kullanılmasının yol gösterici olabileceği önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Daim, M. M., Abushouk, A. I., Alkhalf, M. I., Toraih, E. A., Fawzy, M. S., Ijaz, H., ... & Bungau, S. G. (2018). Antagonistic effects of *Spirulina platensis* on diazinon-induced hemato-biochemical alterations and oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res*, 25(27), 27463-27470.
- Abdel-Daim, M. M., Abushouk, A. I., Bungău, S. G., Bin-Jumah, M., El-Kott, A. F., Shati, A. A., ... & Alkahtani, S. (2020). Protective effects of thymoquinone and diallyl sulphide against malathion-induced toxicity in rats. *Environ Sci Pollut Res*, 27(10), 10228-10235.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaiee, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), RA141-RA147.
- Abolaji, A. O., Adedara, A. O., Adie, M. A., Vicente-Crespo, M., & Farombi, E. O. (2018). Resveratrol prolongs lifespan and improves 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine-induced oxidative damage and behavioural deficits in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, 503(2), 1042- 1048.
- Agarwal, A., Prajapati, R., Singh, O. P., Raza, S. K., & Thakur, L. K. (2015). Pesticide residue in water—a challenging task in India. *Environ Monit Assess*, 187(2), 1-21.
- Akbel, E., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H. H., Kucukkurt, I., & Ince, S. (2018). The subchronic exposure to malathion, an organophosphate pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the protective role of resveratrol. *Toxicol Res*, 7(3), 503-512.
- Akdoğan, A., Divrikli, Ü., & Latif, E. L. Ç. İ. (2012). Pestisitlerin Önemi ve Ekosisteme Etkileri. *Akademik Gıda*, 10(1), 125-132.
- Alavanja, M. C., Hoppin, J. A., & Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health.*, 25, 155-197.
- Altınar, A., Atalay, H., & Bilal, T. (2018). Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilim Derg.*, 7(1), 51-55.
- Arman, M. S. I., Al Mahmud, A., Mahmud, H. R., & Reza, A. A. (2019). Free radical, oxidative stress and diabetes mellitus: NLM ID: 101694476, 6(3), 99-101.
- Berny, P. (2007). Pesticides and the intoxication of wild animals. *J Vet Pharmacol Ther.*, 30(2), 93-100.

- Beutler, E., Duron, O and BM Kelly. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882.
- Braak, N., Neve, R., Jones, A. K., Gibbs, M., & Breuker, C. J. (2018). The effects of insecticides on butterflies—A review. *Environmental pollution.*, 242, 507-518.
- Buszewski, B., Bukowska, M., Ligor, M., & Staneczko-Baranowska, I. (2019). A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides—properties, applications, occurrence, and analysis. *Environ Sci Pollut Res.*, 26(34), 34723-34740.
- Casida, J. E. (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.*, 22(4), 609-619.
- Chen, X., Liang, H., Van Remmen, H., Vijg, J., & Richardson, A. (2004). Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.*, 422(2), 197-210.
- Cherian, D. A., Peter, T., Narayanan, A., Madhavan, S. S., Achammada, S., & Vynat, G. P. (2019). Malondialdehyde as a marker of oxidative stress in periodontitis patients. *J Pharm Bioallied Sci*, 11(Suppl 2), S297.
- Culotta, V. C. (2001). Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Current topics in cellular regulation*, 36, 117-132.
- Cutler, G. C., Scott-Dupree, C. D., Dugas, M. L., & Wang, D. Y. (2006). Susceptibility of Canadian Colorado potato beetle populations to imidacloprid and metaflumizone. *Resistant Pest Management Newsletter*, 16, 33-36.
- Çakır, Ş., & Yamaner, Ş. (2005). Böceklerde insektisidlere direnç. *Ahi Evran Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6(1), 21-29.
- Dalton, T. P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L., & Andrews, G. K. (1996). Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-1 binding activity: occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biochem Physiol*, 271(42), 26233-26241.
- Drabkin, D. L., & Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biochem Physiol*, 112(1), 51-65.
- Draper, H.H., Hardley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431.
- DSouza, U. J. A. (2017). Pesticide Toxicity And Oxidative Stress –A Review. *Borneo Journal of Medical Sciences (BJMS)*, 3-3.

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*, 1(6), 529-539.
- Ferri KF, Kroemer G. (2001). Mitochondria-the suicide organelles. *BioEssays*, 23: 111- 115.
- Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* 53(1), 1-2.
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 20(9), 689- 709.
- Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. (2009). Enviromental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a trois. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 674: 3-22.
- Gastman BR. (2001). Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck*, 23: 409-25.
- Gentz, M. C., Murdoch, G., & King, G. F. (2010). Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control*, 52(3), 208-215.
- Guerrero A, Arias M. (1998).Apoptosis. Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach, Third Edition. Boston, *Acedemic Press*, 159-188.
- Guerrero A, Arias M. (2001). Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach. Third Edition. Boston, *Acedemic Press*, 1171-1184.
- Gupta, R. C., Mukherjee, I. R. M., Malik, J. K., Doss, R. B., Dettbarn, W. D., & Milatovic, D. (2019). Insecticides. In *Biomarkers in toxicology* pp. 455-475. Academic Press.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.*, 35(5), 1147-1150.
- Hanazato, T. (2001). Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. *Environ pol*, 112(1), 1-10.
- Hassan, H. F., Toni, N. D., & Meligi, N. M. (2021). Toxicity Induced by Indoxacarb Exposure in Male Albino Rats and The Possible Protective Effects of Vitamin C and Zinc. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 13(2), 155-176.
- Haya, K. (1989). Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(5), 381-391.

- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*.
- Hempel, K., Hess, F. G., Bögi, C., Fabian, E., Hellwig, J., & Fegert, I. (2007). Toxicological properties of metaflumizone. *Veterinary parasitology*, 150(3), 190- 195.
- Hilton DA, Love S, Barber R. (1997). Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by in situ hybridization using digoxigenin-labelled poly-A oligonucleotide probs to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem*, 1997;42: 13-20.
- Hu, X., Hao, C., Cheng, Z. M., & Zhong, Y. (2019). Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the grapevine superoxide dismutase (SOD) family. *Int J Genom Data Min*, 2019.
- Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*, 48(284), 124-127.
- Yen, T. H., Chen, K. H., Hsu, M. Y., Fan, S. T., Huang, Y. F., Chang, C. L., ... & Cheng, C. M. (2015). Reprint of 'Evaluating organophosphate poisoning in human serum with paper'. *Talanta*, 145, 66-72.
- Karimani, A., Heidarpour, M., & Moghaddam Jafari, A. (2019). Protective effects of glycyrrhizin on sub-chronic diazinon-induced biochemical, hematological alterations and oxidative stress indices in male Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*, 42(3), 300-308.
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*, 575, 525-535.
- Kirtonia, A., Sethi, G., & Garg, M. (2020). The multifaceted role of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1-25.
- Klaunig, J. E. (2018). Oxidative stress and cancer. *Curr Pharm Des*, 24(40), 4771-4778.
- Kurutaş, E. B., & Kılınç, M. (2003). Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(3).
- Le Goff, G., & Giraudo, M. (2019). Effects of pesticides on the environment and insecticide resistance. In *Olfactory Concepts of Insect Control-Alternative to Insecticides* (pp. 51-78). Springer, Cham.

- Li, L., Li, H., Li, Y., Feng, J., Guan, D., Zhang, Y., ... & Li, C. (2021). Ferritinophagy-Mediated ROS Production Contributed to Proliferation Inhibition, Apoptosis, and Ferroptosis Induction in Action of Mechanism of 2-Pyridylhydrazone Dithiocarbamate Acetate. *Oxid Med Cell Longev*, 2021.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., ... & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 13, 757.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Lushchak, V. I., Matviishyn, T. M., Husak, V. V., Storey, J. M., & Storey, K. B. (2018). Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI journal*, 17, 1101.
- Manda, G., Nechifor, M. T., & Neagu, T. M. (2009). Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Current Chemical Biology*, 3(1), 22-46.
- Milošević, M. D., Paunović, M. G., Matić, M. M., Ognjanović, B. I., & Saičić, Z. S. (2018). Role of selenium and vitamin C in mitigating oxidative stress induced by fenitrothion in rat liver. *Biomed Pharmacother*, 106, 232-238.
- Mossa, A. T. H., Mohafrash, S. M., & Chandrasekaran, N. (2018). Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals. *Biomed Res Int*, 2018.
- Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. In: Koopman WJ, editor. A textbook of rheumatology: Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 279(47), 49064-49073.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Invest*, 6(3), 331-336.
- Özoran Y. Apoptosis. In: Robbins S, Cotron R, Kumar V, editors. Basic Pathology. 5th Edition. Philadelphia: WB Saunders company, 1992; 14-15.
- Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002;9(2): 143-148.

- Patlolla, A. K., Barnes, C., Yedjou, C., Velma, V. R., & Tchounwou, P. B. (2009). Oxidative stress, DNA damage, and antioxidant enzyme activity induced by hexavalent chromium in Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 24(1), 66-73.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem*, 209, 112891.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Rashid, A., Nawaz, S., Barker, H., Ahmad, I., & Ashraf, M. (2010). Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217(17), 2933-2939.
- Raofi, R., Jahromi, H. K., Jahromi, Z. K., Abedi, H. A., Sameni, H., & Pourahmad, M. (2016). Antioxidant effects of green-tea on biochemical and histopathological changes of liver in male rats poisoned by malathion insecticide. *Int J Med Res Health Sci*, 5(5), 361-70.
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked?. *J Cell Biochem.*, 118(11), 3577-3585.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616.
- Salgado, V. L., & Hayashi, J. H. (2007). Metaflumizone is a novel sodium channel blocker insecticide. *Veterinary parasitology*, 150(3), 182-189.
- Salgado, V. L. (1990). Mode of action of insecticidal dihydropyrazoles: selective block of impulse generation in sensory nerves. *Pestic Sci*, 28(4), 389-411.
- Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, 360(1), 201-205.
- Schmolke, A., Thorbek, P., Chapman, P., & Grimm, V. (2010). Ecological models and pesticide risk assessment: current modeling practice. *Environ Toxicol Chem*, 29(4), 1006-1012.
- Schneider P, Tschoop J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacotherapy library*, 2000;74: 281-286.

- Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., ... & Abdollahi, M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol*, 24(9), 439-445.
- Shono, T., Zhang, L., & Scott, J. G. (2004). Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol*, 80(2), 106-112.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Curr Opin Toxicol*, 7, 122-126.
- Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- Silver, K. S., Song, W., Nomura, Y., Salgado, V. L., & Dong, K. (2010). Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels. *Pestic Biochem Physiol*, 97(2), 87-92.
- Sinha, A.K., (1972). Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem*. 47(2):389-94. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90132-7.
- Speck-Planche, A., Kleandrova, V. V., Luan, F., & Cordeiro, M. N. D. (2012). Predicting multiple ecotoxicological profiles in agrochemical fungicides: a multi-species chemoinformatic approach. *Ecotoxicol Environ Saf*, 80, 308-313.
- Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Takagi, K., Hamaguchi, H., Nishimatsu, T., & Konno, T. (2007). Discovery of metaflumizone, a novel semicarbazone insecticide. *Veterinary parasitology*, 150(3), 177-181.
- Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., & Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters*, 358(1), 1-3.
- Tripathi, R., Gupta, R., Sahu, M., Srivastava, D., Das, A., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2021). Free radical biology in neurological manifestations: mechanisms to therapeutics interventions. *Environ Sci Pollut Res*, 1-48.
- Tuncer, N. (1986). Klorlu Hidrokarbon Pestisitler ve Poliklorobifenillerin Neden Olduğu Çevre Kirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(10), 123-134.
- Vidyasagar, J., Karunakar, N., Reddy, M. S., Rajnarayana, K., Surender, T., &

- Krishna, D. R. (2004). Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian journal of pharmacology*, 36(2), 76.
- von Stein, R. T., Silver, K. S., & Soderlund, D. M. (2013). Indoxacarb, metaflumizone, and other sodium channel inhibitor insecticides: mechanism and site of action on mammalian voltage-gated sodium channels. *Pesticide biochemistry and physiology*, 106(3), 101-112.
- Wang, Q., Rui, C., Wang, Q., Wang, L., Li, F., Nahiyoon, S. A., ... & Cui, L. (2020). Mechanisms of Increased Indoxacarb Toxicity in Methoxyfenozide-Resistant Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Toxics*, 8(3), 71.
- Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brain, M., Carrell, R.W. (1975) The estimation of red cell superoxide activity. *J Lab Clin Med* 55:337–341.
- World Health Organization. (2009), Pesticide Residues in Food 2009: Evaluations Part II – Toxicological. *World Health Organization*, s:357-418.
- Yaribeygi, H., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2019). A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. *J Cell Physiol*, 234(2), 1300-1312.
- Yılmaz, S., Kaya, E., & Comakli, S. (2017). Vitamin E (α tocopherol) attenuates toxicity and oxidative stress induced by aflatoxin in rats. *Adv Clin Exp Med*, 26(6), 907-917.
- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci* 12(3), 88.

