

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DİFLUBENZURONUN SIÇANLARIN (*Rattus norvegicus*) SERUM  
ASETİLKOLİNESTERAZ (E.C. 3.1.1.8) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Eda YAZICI ÖZÇELİK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2015**

**Her hakkı saklıdır**

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

02.07.2015

Eda YAZICI

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### DİFLUBENZURONUN SIÇANLARIN (*Rattus norvegicus*) SERUM ASETİLKOLİNESTERAZ (E.C. 3.1.1.8) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Eda YAZICI ÖZÇELİK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuri YİĞİT

Bu tez çalışmasında güvenli bir biyosid olarak dikkate alınan ve Halk Sağlığı alanında, özellikle sulak alanlarda, larva mücadelesinde kullanılan ve bir kitin sentez inhibitörü olan diflubenzuronun Wistar sıçanların AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi ve bu etkinin geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesi ve ayrıca sıçan karaciğer histopatolojisine etkisi elektron mikroskopuyla araştırıldı. Kronik olarak düşük dozda diflubenzurona (6 ay boyunca hergün 0,08 mg/l doz) maruz kalan sıçanların kan serum AChE aktivitesi kontrol grubu sıçanlarla benzerlik gösterirken, subakut dozda diflubenzuron (25 mg/10 gün) AChE enzim aktivitesini düşürdü. Maruziyet ortadan kaldırıldıktan 10,15 ve 45. günlerden sonra enzim aktivitesi tekrar ölçüldü ve 45. gün sonunda enzim aktivitesinde az da olsa yükselme görüldü.

Geçirmeli elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde subakut doz diflubenzurona maruz kalmış sıçanlarda hepatositlerin mitokondrilerinde şişme sayılarında artma çekirdeklerinde invaginasyon ve çekirdek içindeki kromatin materyalinin erimesi ve çekirdek zarına yakın yerlerde yığın oluşturması saptandı. Karaciğer sinüzoidlerinde ise bol sayıda eritrosit, Kupffer hücresi ve yağ damlacıkları tespit edildi. Kronik dozda ise kontrol grubundan farklı olarak sinüzoidlerde yağ damlası artışı ve hepatositlerde mitokondri artışı gözlemlendi. Subakut doz uygulamasından sonraki 5, 10, 15. günlerde karaciğer harabiyetinin az da olsa devam ettiği fakat 45. günde tamamen iyileştiği tespit edildi.

Sonuç olarak yapılan yüksek lisans tez çalışması diflubenzuronun sıçanlarda subakut dozunun karaciğer harabiyetine ve kan serum AChE aktivitesinin düşmesine neden olduğunu ve diflubenzuron maruziyetinin ortadan kalkmasından 45 gün sonra bu değerlerin normale döndüğünü ortaya koymaktadır.

**Temmuz 2015, 51 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Asetilkolinesteraz, Diflubenzuron, Karaciğer, Sıçan

## ABSTRACT

Master Thesis

### EFFECT OF DIFLUBENZURON ON SERUM ACETYLCHOLINESTERASE (E.C. 3.1.1.8) OF SERUM

Eda YAZICI ÖZÇELİK

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Nuri YİĞİT

In the study, the effects on rat liver histology and acetylcholinesterase (AChE) activity of the diflubenzuron which is chitin synthase inhibitor and is considered as safe biocide used in insect control in aquatic ecosystems for public healthy were investigated under acute and sub-acute exposures acute and sub-acute. This effect was measured with spectrophotometer whether it is reversible or not. Although chronically blood serum AChE enzyme activity of rats exposed to low-dose (every day for 6 months 0, 08 mg/l dose) diflubenzuron showed similarity to control group, enzyme activity of rats exposed to sub-acute dose (25 mg/10 days) of diflubenzuron was observed to decrease. After sub-acute dose exposure was terminated, AChE activities were measured again in the intervals of 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 45<sup>th</sup> days, and the enzyme activity was observed to slightly increase at the end of 45<sup>th</sup> day.

In consequence of diflubenzuron sub-acute dose (25 mg/ 10 days), the hepatocytes of rat liver with enlarged many of mitochondria, nuclear invagination, melted chromatin material in their nuclei and clumping of chromatin material placed near the nuclear envelope were observed in Transmission Electron Microscopy. Sinusoids of these rat livers contained a great number of lipid droplet, erythrocytes and a few Kupffer Cells. In addition to the sub-acute dose effects, the great number of mitochondria in the hepatocytes and many lipid droplet in the sinusoids were seen in the group with exposed to chronic dose. After the application of sub-acute dose terminated, the liver damages were still observed in 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> days, but histological recover of liver was observed on 45<sup>th</sup> days.

As a results, the present study revealed that sub-acute dose of diflubenzuron cause to liver damage and reduced the AChE activity in blood serum, and after 45 day diflubenzuron exposure terminated, tissue damage and come to normal level.

**July 2015, 51 pages**

**Key words:** Achetylcholinesterase, Diflubenzuron, Liver, Rat

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım andan itibaren tezimin hazırlanması aşamasında bilgisini, alakasını, zor durumlarımda anlayışını ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Nuri YİĞİT'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı); tez çalışmalarımın her aşamasında benim yanımda olan her türlü desteğini esirgemeyen Biyoloji ve Histoloji konusundan kendisinden çok şey öğrendiğim bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Nursel GÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), Yüksek Lisans ders aşamasında bilgileriyle ve içtenlikleriyle üzerimde emeği bulunan tüm hocalarıma, elektron mikroskopu çalışmalarımızda bize yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmalarım sırasında bana manevi destek sağlayan dostlarım Burcu ÇİMEN BEŞİKCİOĞLU ve Pınar ÖZATEŞ'e de teşekkür ederim. Benden manevi ve maddi desteklerini esirgemeyen çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen canım ailem teşekkür ederim.

Son olarak kariyerimde sonsuz desteği olan ve her zaman yanımda olan sevgisini benden esirgemeyen sevgili eşim Emrah ÖZÇELİK'e sonsuz teşekkür ederim.

Eda YAZICI

Ankara, Temmuz 2015

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Biyosidal Ürünler .....	6
2.2 Böcek Büyüme Düzenleyicisi [Insect Growth Regulator (IGR)] .....	7
2.3 Diflubenzuron.....	8
2.4 Karaciğer .....	11
2.5 Asetilkolinesteraz Enzimi .....	12
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1 Deney Hayvanları.....	15
3.2 Hayvanlara Diflubenzuronun Uygulanması.....	15
3.3 Enzim Aktivitesinin Spektrofotometri ile Tayini .....	16
3.4 Elektron Mikroskobu .....	16
4.BULGULAR .....	18
4.1 Asetilkolinesteraz Enzim Tayini .....	18
4.2 Diflubenzuronun Karaciğer Histolojisine Etkisi.....	20
4.2.1 Grup: Kontrol grubu .....	20
4.2.2 Grup: Subakut dozda diflubenzurona maruz bırakılmış deneklerin karaciğer histolojisi .....	22
4.2.3 Grup: Subakut doza maruziyetten 5 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi.....	25
4.2.4 Grup: Subakut doz süresinden 10 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi.....	28
4.2.5 Grup: Subakut doza maruziyetten 15 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi.....	31

<b>4.2.6 Grup: Subakut doza maruziyetten 45 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.7 Grup: Diflubenzuronun kronik dozunun karaciğer histolojisi üzerine etkisi .....</b>	<b>34</b>
<b>5.TARTIŞMA .....</b>	<b>39</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>44</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>51</b>

## KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz Enzimi
BuChE	Butirilkolinesteraz Enzimi
DER	Granülsüz Endoplazmik Retikulum
EMEA	European Medicines Agency
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Food Health Organization
GER	Granülsüz Endoplazmik Retikulum
IGR	Insect Growth Regulator
İTO	Karaciğer Yıldız Hücresi
LD 50	Lethal Doz %50
RNA	Ribonukleik Asit
WHO	World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Diflubenzuronun kimyasal yapısı .....	8
Şekil 4.1 Kronik maruziyet sonucu 5. ayın sonunda sıçanın morfolojik görüntüsü .....	20
Şekil 4. 2 Kontrol grubu sıçan karaciğeri. Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER), Mitokondri (↗), Nukleus (N), sinüzoidal alanda Kupffer Hüresi (Kp) .....	21
Şekil 4.3 Kontrol grubu sıçan karaciğer hepatositinin genel görünüşü .....	21
Şekil 4.4 Hepatosit mitokondri kristalarında bozunma ve düz endoplazmik retikulum keseleri (↘) .....	23
Şekil 4.5 Hepatosit hücrelerinin çekirdeklerinde invaginasyon (↘) ve çekirdek zarına yakın bölgelerde kromatin yığınları (➡) .....	23
Şekil 4.6 Kromatin materyali çözülmüş (↘) ve şekil değişikliğine uğramış hepatosit çekirdeği. Ayrıca mitokondrilerde şişme ve kristalarda erime .....	24
Şekil 4.7 Sinüzoidal alandaki (S) hücreler, hücreyel artık (Ha) ve yoğun madde birikimi (*), Eritrosit (E), Kupffer Hüresi (Kp).....	24
Şekil 4.8 Subakut dozda diflubenzuron uygulanmış karaciğer örneğindeki Kupffer Hücrelerinde (Kp) lizozomların (L) bulunuşu.....	25
Şekil 4.10 Karaciğer sinüzoidindeki yağ damlacıkları, anormal şekilli eritrositler ve Kupffer hücresi. Eritrosit (E), Kupffer hücresi (Kp) ve yağ damlaları (Y) .....	27
Şekil 4.11 Subakut doz uygulamasından 5 gün sonra alınan karaciğerin genel görüntüsü. Sinüzoidal alanlar (↓) .....	27
Şekil 4.12 Subakut dozdan 5 gün sonra normal hücre yapısına sahip hepatositteki GER keseleri (beyaz ok), Mitokondri (M), Nukleus (N) .....	28
Şekil 4.13 Normal çekirdek (N) yapısına sahip hepatositin sitoplâzmasındaki lizozomlar (↖) ve sinüzoidteki eritrositler (E).....	29
Şekil 4.14 Subakut doz sonrası 10 gün normal diyetle beslenen sıçanların karaciğer örneği. Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) , Mitokondriler (M), Vakuol (V), Kupffer hücresi (K), Eritrositler (E) , yağ damlacıkları (Y) ve Hücreyel artık (Ha) .....	30
Şekil 4.15 Kupffer hücrelerinde belirgin sekonder lizozom (↗). Sinüzoidal alanda hücreyel artıklar (Ha) , Vakuol (V).....	30
Şekil 4.16 Sinüzoidlerde az sayıda eritrositler (E).....	31
Şekil 4.17 Subakut doz sonrası 10 gün normal diyetle beslenmiş sıçanın karaciğer hepatositinde genişlemiş GER keseleri, lizozomlar (L) ve mitokondriler (M).....	32
Şekil 4.18 Hepatositte genişlemiş GER keseleri ve DER keselerinin arasındaki mitokondriler.....	32

Şekil 4.19 Diflubenzuron maruziyeti bittikten 45 gün sonra karaciğer hepatosit hücrelerinin düzgün sıralanmış ve hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi. Nükleus (N), Eritrosit (E) .....	33
Şekil 4.20 Aktif bir karaciğer hepatositinde bol sayıda Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) keseleri ve bu keselerin genişlemesi.....	34
Şekil 4.21 Kronik olarak diflubenzurona maruz kalmış sıçan karaciğerindeki hepatositlerde bulunan Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER), Mitokondri (M) ve sinüosit (S) içindeki Kupffer hücreleri (K) ile Yağ damlacıkları (Y).....	35
Şekil 4.22 Sinüzoidal alanlarda (S) Kupffer Hücreleri (K), şekil değişikliğine uğramış eritrosit (E) ve Yağ damlacıkları (Y) .....	36
Şekil 4.23 Hepatositler ve sinüzoidteki Kupffer hücresi (K) ve Nötrofil (N).....	36
Şekil 4.24 Kronik olarak uygulanan diflubenzuron nedeniyle Kupffer hücresinde (Kp) lizozom artışı (→) ve hepatositlerde Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) keseleri.....	37
Şekil 4.25 Kronik dozda diflubenzurondan etkilenmiş sıçan karaciğerindeki sinüzoidlerde yağ artışı (Y) ve hepatositlerin nükleuslarında kromatin yığılımları (→). Kupffer Hücresi (Kp), nükleus (N) .....	37

## 1. GİRİŞ

İnsan yaşam kalitesini bozan besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanması sırasında ekonomik kayıplara ve kontaminasyonlara sebep olan hastalık taşıyıcı vektör özelliği bulunan patojen organizmalar bulunmaktadır (Anonymous 2008a). Bunlarla mücadelede kullanılan biyolojik ve kimyasal ajanlar eski tanımıyla pestisit ‘zararlıyı öldüren’, yeni tanımı ile biyosidal ürünler olarak adlandırılmaktadır. Biyosidal ürünler gerek halk sağlığı ve gerekse ekonomik kayıpların önlenmesinde ekonomik faydalar sağlasa da geniş bir alanda bıraktıkları kalıntılarla su, toprak, hava ve besin kirlenmesine neden olarak ekolojik sistemin dengesini bozmakta ve halk sağlığı üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Biyosidal ürünler etki ettiği canlıya göre sınıflandırılırlar: insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit, nematosit gibi (Anonymous 2008b).

Haşerelerle mücadelede kullanılan insektisitler kimyasal özelliklerine göre organiklorlu insektisitler, organofosfatlı insektisitler, pyretiroidler, karbamatlar, IGR (Böcek gelişim inhibitörü), bakteri kökenli insektisitler olarak sınıflandırılırlar (Toros ve Maden 1985).

Biyosidal ürünler güçlü kolinesteraz inhibitörleridirler (Mason vd. 2000). Özellikle organikfosforlu ve karbamat grubu insektisitler antikolinesteraz bileşikleridir (Kim vd. 1999), hem asetilkolinesteraz (AChE) hem de butirikolinesteraz (BuChE) enzimini inaktive ederler. İsektisitlerin canlının sinir sistemi üzerine yaptığı etkileri ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lefkowitz vd. 2007).

Organofosfatlı insektisitlere akut ve kronik maruziyet sonucunda asetilkolinesteraz enzimi (AChE) inhibisyonunun yanı sıra sinirlerde harabiyet olduğu belirtilmiştir (Smulders vd. 2004). Organofosfatlı ve karbamatlı pestisitler asetilkolinin (ACh) analogları gibi davranırlar (Wilson 2010). Organofosfatlı insektisitler enzime geri dönüşümsüz bağlanırken, karbamat grubu insektisitler enzime geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Bu grup bileşikler asetilkolinesteraz enzimini (AChE) inhibe ederek,

asetilkolinin sinaptik aralıkta birikmesine sebep olur ve kasların sürekli kasılmasını uyarırlar (O'Malley 1997, Solberg ve Beklin 1997).

Karbamat grubu insektisitlerden bendiocarb yetişkin sıçanlara 2 sene süre ile oral yoldan 10 mg/kg/gün uygulanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda organların ağırlıklarında, kan ve idrar kompozisyonunda değişiklikler gözlenmiştir (Baron 1991).

Gomes vd. (1999) 6 farklı organofosforlu insektisit karışımını 7 hafta boyunca sıçanlara oral yoldan uygulamışlar ve karaciğerde aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Aynı çalışmada eritrosit asetilkolinesteraz aktivitesinde ve total serum proteinlerinde ise azalma görülmüştür.

Organofasfat, karbamat, piretroit ve organoklorin grubu insektisitler, insanların sinir sistemini etkilemektedir. Bu kimyasallar nörotransmisyonu veya iyon kanallarındaki akımı engelleyerek, nörotoksik etki gösterirler. Costa vd. (2008) yaptığı çalışmada, bu etkilerini Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların da sebebi olabileceğini öne sürmüşlerdir.

İnsektisitler toksik maddelerdir. Toksik maddeler büyük oranda karaciğerde detoksifiye edilirler. Toksik maddeler nedeni ile karaciğerin detoksifikasyonu yeteneği azalır, protein sentezi inhibe olur ve kan serumunda bu organın harabiyetinin göstergesi olarak kullanılan enzimlerin aktivitelerinde artış gözlenir (Aras ve Ersan 1992).

Böbrekler, insan vücudundaki toksinleri ayıran önemli organlardan biridir. Endosülfana maruz bırakılmış fare böbrek dokusunda, mononükleer hücre infiltrasyonu tesbit edilmiş, aynı zamanda proksimal tubul hücrelerinin tahrip olduğu, çekirdeklerin kontrol grubuna göre aşırı derecede şiştiği görülmüştür (Özata 1983, Karaöz vd. 2001). Malathionun böbrek alkalen fosfataz aktivitesini artırıp, karaciğer ve ince bağırsak alkalen fosfataz aktivitesini azalttığı gözlenmiştir (Dere vd. 1999).

Organiklorlu insektisit olan endosülfan tarım alanlarında haşerelere karşı yaygın olarak kullanılır. Deney hayvanlarının böbrek dokularında endosülfanın etkilerini araştırmak için yapılan deneylerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve proksimal tübül hücrelerinde tahribat gözlenmiştir (Singh ve Pandey 1999). Sıçan böbrek dokularında akut toksisiteyi belirlemek amacıyla sıçanlara farklı dozlarda endosülfan uygulanmış ve sıçanların böbrek dokularında glomerüller ve tübüllerde morfolojik değişiklikler, damar çevresinde hücre infiltrasyonu görülmüştür (Kayhan vd. 2009).

Organofosfatlı insektisitler akut belirtilerini, maruziyet esnasında ya da sonrasında saatler hatta dakikalar içinde gösterebilirler. Maruziyet solunum, gastrointestinal yolla ya da temas ile gerçekleşebilir. Solunum ile maruziyette belirtiler hemen gözlenirken, gastrointestinal yolla maruziyet biraz daha yavaş belirti verir. Organofosfatlı insektisitler belirtilerini merkezi sinir sisteminde ve kaslarda gösterir (Taylor 1985). Organofosfatların subletal dozlarda kuşlarda ve memelilerde üreme performansında değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (Somkuti vd. 1987, Maitra ve Sarkar 1996). Ayrıca karaciğerde (Nakagawa 1999), immün sistemde (Handy 2002) ve pankreasta (Hagar ve Fahmy 2002) sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ulusoy vd. (2004), organofosfatlı bir insektisit olan diazinonun sıçan hepatositleri üzerine etkisini elektron mikroskopunda incelemişlerdir. Birinci haftanın sonunda hepatositlerde herhangi değişme gözlenmemiştir. İkinci haftada hepatositlerin mitokondrilerinde hafif şişme, üçüncü haftanın sonunda mitokondrilerde aşırı şişme, dördüncü haftanın sonunda hepatositlerde de şişme ve mitokondrilerde vakualizasyon ve son olarak beşinci haftanın sonunda hepatositlerde piknotik çekirdek, sitoplâzmadaki çözümler ve mitokondrilerde aşırı şişmeler gözlenmiştir.

Organofosfatlı insektisit olan diazinona 0.2, 2, 25 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak 28 gün boyunca maruz kalan dişi farelerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (Neishabouri vd. 2004).

Gökalp vd. (2005), sıçanlara medhidathion (5 mg/kg) ile vitamin E (50 mg/kg) ve vitamin C (20 mg/kg) uygulamışlardır. Sadece medhidathion uygulanan grupta serum asetilkolinesteraz aktivitesinde azalma, malondialdehit seviyesinde artış ve böbrekte

histopatolojik değişiklikler gözlenmiş ve vitamin uygulanmasıyla bu değişikliklerin azaldığını açıklamışlardır.

Jeong vd. (2006), organofosfatlı insektisit olan klorprifos-metili 7 hafta süre ile 100 mg/kg dozunda sıçanlara uygulamışlardır. Vücut ağırlıklarında kontrol grubu ile kıyaslandıklarında önemli bir değişikliğin olmadığını belirtmişlerdir, ancak sıçanların karaciğer, dalak, böbrek ve beyin ağırlıklarında artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Organofosfatlı bir insektisit olan diazinon vücuda alındıktan sonra üriner sistem ile vücuttan uzaklaştırılır (Dwivedi ve Khanna 1988). Ural vd. (2006), akut diazinon toksisitesinin testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikleri saptamak amacı ile erkek sıçanlarda çalışmışlardır. Deneplerinde iki grup oluşturmuşlar (1.grup kontrol grubu, 2.grup LD<sub>50</sub> dozunda diazinon uygulanmıştır). Kontrol grubu sıçanlarda leyding hücrelerinin, damarların normal histolojik yapı gösterdiği saptanmıştır. LD<sub>50</sub> dozu uygulanmış sıçanlarda germinal epitel diziliminde bozulmalar, seminifer tübüllerde hücre sayısında azalma, damar duvarlarında kapiller dilatasyon gözlenmiştir.

Piretroit türevi bir insektisit olan permethrinin farklı dozlarının farelerin karaciğer ve dalak hücrelerine histopatolojik ve histokimyasal etkileri çalışılmıştır. Permethrinin karaciğer hücrelerinde ağır hasarlı değişmelere neden olduğu saptanmıştır. Öreneğin hepatositlerin çekirdek boyutunda azalma gözlenmiştir. Kupffer hücrelerinin çoğalmasında, hepatositlerin sitoplâzmalarında vakuollerin, lipidlerin, polisakkaritlerin ve proteinlerin miktarında artışa ve hepatik kapillerin tıkanmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Roma vd. 2012).

Zararlı artropodlarla mücadelede kullanılan insektisitler arasında hedef dışı organizmaya toksisitesinin az olması nedeniyle son zamanlarda en çok böcek gelişim düzenleyicileri (Insect Growth Regulators, IGRs) kullanılmaktadır. Böcek gelişim düzenleyicileri (IGRs) başkalaşım veya kutikulanın değişimi esnasında dış iskeletin oluşumunu sağlayan kitin sentezini engellerler (kitin sentez inhibitörleri), ya da büyüme

gelişme hormonu gibi görev yaparlar ve hormon dengesizliği sebebi ile başkalaşım evreleri (yumurta-larva-pupa-erişkin) arasında bireyin bir üst safhaya geçmesini engelleyerek etki ederler (Koçak vd. 1997, Ware 2000, Salokhe vd. 2012, Mars 2012).

IGR'ler juvenil hormon analogları ve kitin sentez engelleyiciler olmak üzere 2 tip olarak kullanılmaktadır. Sıçanlara 6 ay boyunca diyetle verilen IGR grubu insektisitlerden juvenil hormon analogunun "pyriproxyfen" dokulara etkisi araştırılmıştır. Farklı dozlarda (0, 80, 400, 2,000 ve 10,000 ppm) 6 ay süre boyunca diyetle uygulanan pyriproxyfenin uygulanan en yüksek dozunda (10.000 ppm) sıçanlarda kilo kaybına, kan parametrelerinde değişikliklere, karaciğer, böbrek ve tiroid bezlerinde büyümeye neden olduğu tespit edilmiştir (Koyama vd. 1989).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda, yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında özellikle sivrisinek ve karasinek gibi haşerelerin larvalarında kitin sentezini engelleyen diflubenzuronun hedef dışı organizmalardan memeli hayvanlar üzerine nasıl etki yaptığı araştırılmıştır. Bu konuyla ilgili olarak sıçanlarda serum asetilkolinesteraz aktivitesi biyokimyasal teknikle, karaciğer histolojisi ise elektron mikroskobu tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca sıçanlara diflubenzuronun etkisinin AChE aktivitesindeki değişiminin belirteç olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Biyosidal Ürünler

Dünya çapında yılda ortalama 2,5-3 milyon ton biyosidal ürün kullanıldığı ve bu bileşiklerin yaklaşık %46'sının herbisit, %31'inin insektisit, %18'inin fungusit olduğu tahmin edilmektedir (Dağ 2000). Biyosidal ürünler etki ettiği canlıya göre;

- İsektisitler ( böcekleri öldüren pestisitler),
- Herbisitler (otları öldüren pestisitler),
- Fungusitler (mantarları öldüren pestisitler),
- Akarisitler (akarı öldüren pestisitler),
- Nemasitler (nematodları öldüren pestisitler),
- Molluskositler (yumuşakçaları öldüren pestisitler),
- Rodentisitler (kemirgenleri öldüren pestisitler) olarak sınıflandırılabilirler (Anonymous 2008a).

İsektisitler pestisitler 'biyositler' içerisinde öldürücü etkisi en fazla olan gruptur (Anonymous 1993). İsektisitlerin seçici özellikleri yoktur. Hedef organizmalar kadar hedef olmayan organizmaları da etkiler. Besin maddeleri üzerinde, toprakta ve suda uzun süre parçalanmayan böcek öldürücüler doğal dengeyi bozarlar. İsektisitler yüksek yapılı organizmalara hatta insanlara besin yoluyla bulaşarak halk sağlığının bozulmasına neden olurlar. Genellikle böcekler ve benzeri haşereler ile mücadelede altı temel insektisit kullanılır:

1. Organiklorlu insektisitler
  2. Organofosfatlı insektisitler
  3. Pyretiroidler
  4. Karbamatlar
  5. IGR( Böcek gelişim inhibitörü)
- Kitin sentez inhibitörü

- Juvenil hormon analogları
- 6. Bakteri kökenli insektisitler
  - *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti)
  - *Bacillus sphaericus* sp.
  - *Spinosad* (*Saccharopolyspora spinosa*)

## 2.2 Böcek Büyüme Düzenleyicisi [Insect Growth Regulator (IGR)]

Son yıllarda klasik insektisitlerin yerine çevreye ve hedef dışı organizmalara karşı etkisi son derece az olan, Insect Growth Regulator (IGR) (böcek büyüme düzenleyicisi) denilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu madde böceklerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen 3. nesil insektisit olarak da bilinmektedir. IGR grubu insektisitler ikiye ayrılır (Eritja vd. 2005).

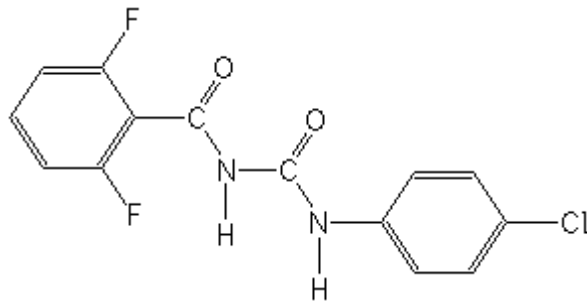
1. **Juvenil Hormon Analogları:** Böceklerin yumurtadan ergin oluncaya kadar gelişimleri juvenil hormon (JH) ve ecdizon hormonu tarafından kontrol edilmektedir. Bu iki hormon vücutta daima denge halindedir. Bu iki hormondan birinin normalden fazla veya eksik olduğunda normal gelişmeyi geciktirir veya durdurur (Koçak vd. 1997). Bu hormonlar böceğin bir dönemden diğer bir döneme geçmesini önleyerek, başkalaşımına engel olmaktadır. Juvenil hormon analogu olarak hydroprene, fenoxycarb, pyriproxyphen gibi kimyasallar kullanılmaktadır.
2. **Kitin Sentez İnhibitörleri:** Kitin (N-asetilglukozamin) böceklerin dış iskeletini oluşturan polimer bir maddedir. Kitin sentez inhibitörleri böceklerde kitin sentezini durdurur. Böcek yeni dış iskeleti oluşturamaz ve ölür. Kitin sentez inhibitörü olarak diflubenzuron, hexaflumuron, lufenuron gibi kimyasallar kullanılmaktadır (Mars 2012).

### 2.3 Diflubenzuron

Kitin sentez inhibitörlerinin ilk bileşiği olan diflubenzuron 1970'li yılların başında Philips-Duphar Laboratuvarları'nda geliştirilmiştir (Van Daalen vd. 1972), (Şekil 2.1).

Sivrisinek ve karasinek gibi sinek larvalarına karşı halk sağlığı uygulamalarında kullanılan diflubenzuron benzoilfenil üre grubundan, mide ve temas yolu ile etkili insektisittir (Anonymous 2008a). Bu insektisit kitin sentezini inhibe eder, kütikula oluşumunu ve eski derinin atılmasını engeller. Larvalarda eski derinin atılmasını engellediği için ölüm ya eski deri atılırken sıvı kaybından dolayı (Mulder ve Gijswijt 1973) ya da eski deriyi atmaya başaramadan ölüm meydana gelmektedir (Ascher ve Nemy 1976).

Diflubenzuron 1980 yılından beri farklı ülkelerde sivrisinek kontrolünde kullanılmaktadır (Mulla vd. 1975, Mittal ve Kohli 1988). Baruah ve Das (1996), farklı yaşam ortamlarında gelişim gösteren sivrisinek larvalarına karşı diflubenzuronun oldukça etkili olduğunu ve bilinen diğer larvasit ve biyositlerden daha etkin olduğunu yaptıkları deneyde saptamışlardır.



Şekil 2.1 Diflubenzuronun kimyasal yapısı <http://www.alanwood.net>

Diflubenzuron ile muamele edilen *Leptinotarsa decemlineata* larvalarında yeni oluşturulan kutikular tabakanın yavaş yavaş azalarak bozulduğu ortaya konulmuştur (Grosscurt 1978).

Delbeke vd. (1997), diflubenzuron, pyriproxyfen, imidacloprid ve diafenthiuronun *Orius laevigatus* (tahtakurusu) bireylerine toksik etkisini araştırmışlardır. *O. laevigatus* nimflerine uygulanması sonucunda diflubenzuron ve pyriproxyfenin temas yolu ile maruz kalındığında yüksek derecede etkili olduğu saptanmıştır.

Diflubenzuronun 2 farklı formülasyonu (Micromite® 4L ve 80 WG) ve sprej oil FC 435- 66 turuncgil ağaçlarına belli süre uygulandıktan sonra kalıntılarının artropod türü olan *Diaprepes abbreviatus*'un yumurta gelişimine etkisi çalışılmıştır. Kontrol grubu ve sprej oil formülasyonun önemli bir mortalite gözlenmezken, 80 WG ve 4 L formülasyonlarının yumurta açılımını önemli ölçüde etkilediği gözlemlenmiştir. 80 WG formülasyonunun 4 L formülasyonun mortalitesinden daha yüksek olduğu 1 günün sonunda 4 L formülasyonundaki mortalite %1 iken 80 WG formülasyonundaki mortalitenin %60 ile %64 arasında olduğu gözlemlenmiştir (Adair ve Mehta 2001).

Robert ve Olson (1989), organofosfatlı insektisit olan malahtion ve metoprenin subletal dozlarını *Culex quinque fasciatus*'un 4.evre dışı larvalarına uygulandığında ergin böcekte yumurta üretimini, yumurtanın hacmi ve yumurta açılımını azalttığını ayrıca kanat uzunluğu ve yaşam süresini kısalttığını tespit etmişlerdir.

Wang vd. (2008), organofosfat, karbamat, piretroid, nikotinik insektisitler ve böcek gelişim inhibitörlerinin (IGR) de içinde yer aldığı 14 insektisiti *Nilaparvata lugens* 'in parazitoidi *Anagrus nilaparavatae*' ye oral yoldan ve temas yoluyla uygulayarak akut toksisitesini araştırmışlardır. Organofosforlu insektisit olan dichlorvosun kullanılan insektisitler arasında en fazla toksik etkisinin olduğu ve 2 saat içinde tüm bireylerin ölümüne sebep olduğu (%100) belirtilmiştir. Nikotinoid insektisit olan imidachloprid ise ikinci sırada etkili olduğu ve 4 saat içinde tüm bireyleri öldürdüğü saptanmıştır.

Böcek gelişim inhibitörlerinin akut olarak en düşük toksisiteye sahip olduğu ancak oral olarak alındığında doğurganlığı ve yaşam süresini azalttığı gösterilmiştir.

Levot ve Sales (2008), koyun bitlerine diflubenzuronun etkisini araştırmışlardır. Diflubenzuron solüsyonunun 250 mg/l'sinin 0,2 µl'si (0,05µl/bit) nimf üretimini ve yumurta açılımını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir.

Diflubenzuron sivrisinek larvalarına karşı yüksek toksik etki gösterirken; memeli, kuş, balık, arı ve birçok akuatik omurgasız canlılara karşı düşük toksik etki göstermektedir (Anonymous 1995). İnsektisitler veya sentetik kimyasal ilaçlar besin zinciri yolu ile kullanım alanlarının dışına çıkarak, hayvanları ve bu hayvanlarla beslenen ya da etkileşim halinde bulunan insanları olumsuz yönde etkiler. İnsektisitler ya da kimyasallar tüm canlılarda metabolik bozukluklara, doku ve organ hasarına sebep olurlar (Kayhan vd. 2009).

Üç hafta boyunca 1000 ve 2000 ppm diflubenzuron içeren besinler farelere verilmiş ve bunun sonunda siyanozis ve fare kanında 200 ppm sulfhemoglobin gözlenmiştir. Farelere 2000 ppm uygulanan diflubenzuronun etkisiyle 31. günün sonunda total hemoglobin miktarındaki sulfhemoglobinin %13'e ulaştığı görülmüştür. Besin ile diflubenzuron verilmesi kesildikten 3 hafta sonra hemoglobin seviyesinin normale döndüğü gösterilmiştir (Bently vd. 1978).

Diflubenzuronun ve temel metabolitleri (2,6-difluorobenzoik asit (DFBA) ve 4-chlorofenilurea) ile in vivo ve in vitro koşullarda yapılan mutajenik testler sonucunda hem diflubenzuronun hem de temel metabolitlerinin mutajenik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Diflubenzuronun ikincil metaboliti 4-kloranilin in vitro koşullarda sıçanlarda ve farelerde karsinojenik olduğu belirtilmiştir (Anonymous 1995).

Diflubenzuronun minör metaboliti olan 4-kloroanilin (PCA) mutajen bir bileşiktir ve ilaçlama sektöründe çalışan işçilerde veya yeni doğan bebeklerde maruziyet sonucu methemoglobinaemia denilen mavi bebek sendromuna neden olmaktadır (Harmon 1995).

Deney hayvanlarında, diflubenzuronun farklı dozlarıyla yapılan kronik toksisite çalışmalarında methemoglobinin kimyasal yapısında değişiklikler gözlenmiştir (Anonymous 1981). Diflubenzuron nedeniyle methemoglobinin hemoglobine dönüşemediği, kanda methemoglobin seviyesinin arttığı ve oksijen taşıyamaz duruma geldiği saptanmıştır.

IGR grubu insektisit olan diflubenzuronun ve pyriproxyfenin sitotoksitesi Bayuumi vd. (2003) tarafından nötral red deneyiyle CHO-K1 memeli hücrelerinde denenmiştir. Uygulama zamanına bağlı olarak her iki insektisit sitotoksik olduğu belirtilmiştir.

## **2.4 Karaciğer**

Vücudun en büyük iç organı karaciğerdir. Genel yapısına bakılacak olursa karaciğer histolojisinin %75'ini hepatosit hücreleri oluşturur. Hepatosit hücrelerinin arasında sinüzoidal alanda fagositoz ve hücre haberleşmesinden sorumlu Kupffer hücreleri ve kan damarları bulunur. Hepatositlerin arasındaki hücreler arası aralığa disse aralığı denir ve bu bölgede yağ depolayan ve hepatositler arası haberleşmeden sorumlu karaciğer yıldız hücreleri (ITO) denilen hücreler bulunur (Junquera vd. 1998, Temel vd. 2002, Aktan vd. 2003). Hepatosit, karaciğer lobüllerinin fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücreleridir. Hepatositler kan plazma proteinlerinin üretilmesi ve endokrin sisteme salınımı, birçok ilacın sebep olduğu toksik maddelerin detoksifikasyonu, aminoasitlerin deaminasyonu ve böbreklerden üriner sistemle dışarı atılması, trigliserit ve glukojen depolanması gibi görevleri vardır. Hepatositler sitoplazmalarında, glikojen, lipit sentezi ve detoksifikasyonda etkili olan molekülleri üreten iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum (SER) bulundurur. Bu organelin membranlarında bulunan enzimler, bilirubin, steroidler ve ilaçların glükuronid ile konjugasyonu ve lipitte

eriyeblen ilaçların detoksifikasyonundan sorumludur, ayrıca sahip olduğu bu görevlerinden dolayı enerji ihtiyacının fazla olması sebebi ile bol miktarda mitokondri organeline sahiptir (Kierszenbaum 2006).

Young vd. (1986) oral yolla diflubenzuron uyguladıkları Swiss Webster farelerin karaciğer dokularını ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Işık mikroskopunda portal ve central damarların arasında hepatoselüler vakoulizasyon tespit etmişlerdir. Elektron mikroskobu ile yaptıkları çalışmalarda hepatositlerde endoplazmik retikulum yoğunluğunda yükselmenin olduğunu belirlemişlerdir.

Saleem vd. (1995) farklı grup insektisitlerin insan karaciğer, böbrek, beyin ve kas dokularındaki proteolitik enzimlere karşı etkisini araştırmışlardır. Diflubenzurona maruz kalan dokuların tümünde proteaz aktivitesinin inhibe olduğu gösterilmiştir.

El-Sebae vd. (1988) curacron (profenofos), sumicidin (fenvalerate), dimilin (diflubenzuron)'in invitro şartlarda tavşanların kas ve karaciğer dokularında RNA ve protein sentez oranını etkilemesini incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre RNA ve protein sentezinin tavşanların karaciğerinde uyarıldığı ve kaslarda inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Kullanılan bu pestisitlerde diflubenzuronun tavşanların karaciğer ve kasında RNA ve protein sentezini maksimum düzeyde etkilediği dikkat çekmiştir.

## **2.5 Asetilkolinesteraz Enzimi**

Hayvanlardaki metabolik olaylarda görevli enzimlerin insektisitlerin etkisiyle aktivitelerinin sınırlandığına veya arttığına, dokularda hücre hasarına sebep olduklarına dair birçok çalışma vardır. Enzim, organizmadaki metabolik olayları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizördür (Noyan 2008). Bunlardan asetilkolinesteraz enzimi (AChE) ise karaciğerde sentezlenir. AChE ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmoneta*) elektrik organından saflaştırılmıştır.

İnsan beyinde iki tip kolinesteraz bulunur. Bunlardan birincisi 7. kromozom tarafından kodlanan asetilkolinesterazdır (AChE, EC 3.1.1.7). İkincisi ise 3. kromozom tarafından kodlanan butirikolinesterazdır (BuChE, EC 3.1.1.8) (Mesulam ark. 2002). Her iki esterazın da hem homolog yapıları hem aminoasit sekansları çok benzerdir (Kutty 1980). Asetilkolinesteraz eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında ve beyin gri maddesinde; Butirikolinesteraz ise karaciğer, pankreas, kalp, serum ve beyin beyaz maddesinde bulunmaktadır.

Maduenho ve Martinez (2008) tatlı su balığına (*Prochilodus lineatus*) 25 mg diflubenzuron uygulamışlar ve 6, 24 ve 96 saatin sonunda kas AChE enzimi, detoksifikasyon ve antioksidan enzimlerine, hematolojik ve fizyolojik parametrelerini ve karaciğere histopatolojik etkilerini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda 6, 24 ve 96 saatlerin sonunda tüm örneklerde kas AChE seviyesinin düştüğünü belirtmişler ve buna neden olarak diflubenzuronun AChE inhibitörü olduğunu göstermişlerdir.

Nörotransmitter madde olan AChE, asetilkolini, kolin ve asetik asite parçalayan merkezi ve periferik sinir sisteminde, nöromusküler kavşaklarda ve eritrositlerde bulunmaktadır. Organofosfat ve karbamat grubu insektisitler, asetilkolinesteraz enzimini, aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler (Katz ve Brooks 2009).

Karbosulfanın gökkuşığı alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) eritrosit asetilkolinesteraz enzimi aktivitesine etkisini araştırılmıştır. Gökkuşığı alabalıkları 60 gün boyunca karbosulfana (35 µg/l) maruz bırakılmıştır. Kronik testin sonunda gökkuşığı alabalıklarında çok daha az hareketlilik, huzursuzluk, renkte kararma, denge kaybı gibi davranış bozuklukları ve asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonunun 3. haftaya kadar devam ettiği tespit edilmiştir (Çapkın 2011).

Yetişkin erkek sıçanlara, bir insektisit olan cyonophos'un asetilkolinesteraz, aspartat transminaz (AST), alanin transminaz ve alkalın fosfataz (ALP) enzim aktivitelere etkisi araştırılmıştır. Oral ve dermal yoldan maruz kalan sıçanlarda 3. günün sonunda AChE aktivitesinin inhibe olduğu ve 15. günün sonunda geri dönüşümün gerçekleşmediği gözlenmiştir. Oral ve dermal yoldan maruz kalındığında kolesterol seviyesinde bir değişiklik gözlenmezken AST ve ALT aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Moneim vd. 2011).

AChE vücuttaki toksik maddelerin belirteci olduğu bilinmektedir. Organofosforlu ve karbamat grubu pestisitler ile temas eden canlıların bu ürünlerden ne kadar etkilendiğini, duyarlı ve kullanışlı biyomarker olan eritrosit ve plazma kolinesteraz belirlenmesi ile anlaşılır (Zimmer vd. 2012).

Diflubenzuron ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında diflubenzuronun memeli kan serum asetilkolinesteraz enzimi seviyesine olan etkisiyle ilgili çalışma oldukça azdır. Bu kapsamda yaptığımız yüksek lisans tez çalışmasında diflubenzuronun subakut ve kronik maruziyet sonucu kan plazma astilkolinesteraz enzimine etkisi ve dolaylı olarak enzimin karaciğerde üretilmesi ve karaciğerin kimyasal maddelerin detoksifikasyon merkezi olması sebebi ile karaciğer dokularına etkisi çalışılmıştır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Deney Hayvanları**

Çalışmada kullanılan Wistar Albino sıçanlar (250-300 g) Refik Saydam Hıfzısıhha Müdürlüğü Deney Hayvanları üretim merkezinden alındı. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesinde bulunan deney hayvanları biriminde hayvan deneyleri etik kurallarına uygun şekilde barındırıldı ve denemelerde kullanıldı. Subakut ve kronik incelemeler toplamda 25 sıçan üzerinde yapıldı. Subakut çalışmada kullanılacak olan sıçanlar (n=15) kontrol grubu (n=5) ve çalışma grubu (n=10) olarak, Kronik çalışmada kullanılan sıçanlarda kontrol grubu (n=2) ve çalışma grubu (n=8) olarak ayrıldı. Denemeye başlamadan önce tüm sıçanlar 10 gün karantina altına alındı. Hayvanların her biri ayrı kafeslerde olmak üzere uygun fotoperiyot (12 saat aydınlık-12 saat karanlık) ve oda sıcaklığında (24±1 °C) tutuldu.

#### **3.2 Hayvanlara Diflubenzuronun Uygulanması**

Deneylerde diflubenzuronun etkisini gözlemek için sıçanlardan kan ve karaciğer örneklerini elde etmek amacıyla deney hayvanları 7 gruba ayrıldı.

1. Grup: Kontrol grubu
2. Grup: Diflubenzuronun subakut dozda diflubenzurona maruz bırakılmış deneklerin AChE enzim aktivitesi ve karaciğer histolojisi
3. Grup: Subakut doz süresinden 5 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi
4. Grup: Subakut doz süresinden 10 gün sonra diflubenzuronun AChE enzim aktivitesi ve karaciğer histolojisi üzerine etkisi
5. Grup: Subakut doz süresinden 15 gün sonra diflubenzuronun AChE enzim aktivitesi ve karaciğer histolojisi üzerine etkisi
6. Grup: Subakut doz süresinden 45 gün sonra diflubenzuronun AChE enzim aktivitesi ve karaciğer histolojisi üzerine etkisi

## 7. Grup: Kronik dozda diflubenzuronun AChE enzim aktivitesi ve karaciğer histolojisine etkisi

Subakut çalışmada kullanılacak olan sıçanlara hergün olmak üzere 10 gün süre içinde 50 gr fıstık ezmesi içinde 25 mg/10 gün (LD<sub>50</sub> dozunun yaklaşık 5 katı) diflubenzuron verildi. Kronik incelemelerde kullanılacak olan sıçanlara ise 6 ay boyunca içme sularına 0,08 mg/l (suda çözünen miktarı) diflubenzuron uygulandı. Ayrıca sıçanlardan subakut dozdan sonraki bütün karaciğer örnekleri alınırken kan örnekleri 10, 15, ve 45. günlerde alındı.

### 3.3 Enzim Aktivitesinin Spektrofotometri ile Tayini

Deney hayvanlardaki asetilkolinesteraz enzim aktivitesi Ellman metoduna göre yapıldı (Ellman vd. 1961). Bu metoda göre deneme süresi sonunda kontrol grubu ve diflubenzuron uygulanmış sıçanlardan kan örnekleri uygun yöntemlerle EDTA' lı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri 3000 devirde 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj edilmiş kandan 0,2 ml kan serumu başka bir tüpe alındı ve üzerine 0.8 ml %0.9'luk izotonik NaCl ilave edildi. Bir ependorf tüpüne 1,5 ml Na-Fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ve üzerine enzim substratından (Butyrylthiocholine) 50µl ilave edildi. Hazırlanan çözelti daha önce 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dk bekletildi. Su banyosunda çıkartılan çözeltiliye kan serumundan (serum + NaCl) 10 µl eklenip spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda 30 saniyede bir olmak üzere 6 ölçüm yapıldı. Spektrofotometreden alınan değerler doğrultusunda aşağıdaki formüle göre enzim aktivitesi saptandı.

Okumalar arası farklar x 23.460 = sonuç (u/l)

### 3.4 Elektron Mikroskobu

Kontrol grubu ve diflubenzuron uygulanmasından belli süreler sonunda eter anestezisi altında deney hayvanlarından karaciğer örnekleri alındı. Doku örnekleri aşağıdaki işlemlerden geçirilerek elektron mikroskobunda incelenmeye hazırlandı:

- i. Deney hayvanlarından alınan örnekler, 0,1 M Sodyum fosfat tamponunda (pH 7,4) yıkandı.
- ii. Sodyum fosfat tamponunda hazırlanan %2,5'luk Gluteraldehit ile dokuların birinci tespiti yapıldı (2 saat, +4 °C'de).
- iii. İlk tespit işleminden sonra örnekler, aynı tampon ile 1 saatte 3 kez solüsyon değişimi yapılarak yıkandı.
- iv. Örneklerin, sodyum fosfat tamponunda hazırlanan %1'lik Osmiyum tetroksit çözeltisi ile ikinci tespiti yapıldı (1 saat, +4 °C'de).
- v. İkinci tespit işleminden sonra örnekler, aynı tampon ile 1 saatte 3 kez solüsyon değişimi yapılarak yıkandı.
- vi. Fiksasyon işlemlerinden sonra, örnekler çeşitli derecelerdeki alkol serilerinde (%70'lik, %80'lik, %90'lık, %100'lük, %100'lük etanol) 5'er dakika bekletilerek dehidrasyonu yapıldı.
- vii. Dehidrasyondan sonra gömme ortamına geçiş aşamasında,  
3 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit CY212 gömme ortamı,  
1 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit CY212 gömme ortamı  
1 hacim Propilen oksit + 3 hacim Araldit CY212 gömme ortamı  
karışımında 30'ar dakika bekletildi.
- viii. Örnekler sonra bloklar içindeki Araldit CY 212 gömme ortamına alınıp etüvde 45°C'de 24 saat ve 70°C'de 48 saat bekletildi.
- ix. Gömme ortamında bloklanmış örneklerden ultramikrotomla yarı ince ve ince kesitler alındı.
- x. Yarı ince kesitler (0,5–1,5 µm), Toluidin blue ile boyandı ve Nikon-Eclipse marka ışık mikroskopunda incelendi.
- xi. Bakır gritler üzerine alınan ince kesitler (70–90 nm) Kurşun sitrat ve %2'lik uranil asetat ile boyandı. Kesitler Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Jeol JEM 1400 (120kV) marka Geçirmeli Elektron Mikroskobu'da incelendi (Hayat 1981).

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında diflubenzurona doğrudan maruz kalınma durumunda bu maddenin kan serum asetilkolinesteraz enzimi seviyesine etkisi ve maruziyet ortadan kalktığında serum asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin tekrar eski seviyesine geri gelip gelmediği araştırıldı. Ayrıca karaciğerin kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda rol alan bir organ olması, asetilkolinesterazın çoğunlukla karaciğerde üretilmesi diflubenzurona maruz kalan sıçanların karaciğer dokularındaki oluşabilecek hasarların araştırılmasını önemli kılmaktadır ve bu çalışmayla diflubenzuronun karaciğer hücreleri üzerine etkisi de ortaya konmuştur.

### 4.1 Asetilkolinesteraz Enzim Tayini

Asetilkolinesteraz aktivitesinin saptanması amacıyla yapılan denemelerde öncelikle kontrol grubu sıçanların kan serum asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ölçülmüş ve asetilkolinesteraz enzim seviyesi 586,50 – 563,04 u/ ml arasında bulunmuştur.

Deney hayvanlarına, diflubenzuronun subakut olarak maruziyetinin (25 mg/10 gün) sonuçlarını saptamak için yapılan çalışmalarda 7 örneklilik bir denek grubu oluşturularak asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin ölçümleri yapılmıştır. Deneklere fıstık ezmesi içinde hazırlanmış 25 mg/10gün'lük diflubenzuron yedirilmiştir. On günün sonunda disekte edilen sıçanlardan alınan kan örneklerinde Ellman metodu ile asetilkolinesteraz enziminin aktivite tayini yapılmıştır. Diyetinde diflubenzuron bulundurulan sıçanların asetilkolinesteraz enzim aktivitesisıraıyla n1) 351,90 u/ ml, n2) 304,98 u/ ml, n3) 258,06 u/ ml, n4) 328,44 u/ ml, n5) 281,52 u/ ml, n6) 1173 u/ ml, n7) 1126,80 u/ ml olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu sıçanlara göre subakut doza maruz kalan sıçanların asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde belirgin bir düşme görülmüştür. Ancak 6 ile 7 numaralı sıçanlarda asetilkolinesteraz enzim aktivite seviyesinin normalden yüksek çıkmıştır. Bunun nedeninin hayvanların kanlarının hemoliz olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Subakut dozda diflubenzurona maruz kalan deney havyanlarında morfolojik olarak kıl yoğunluğunda azalma, strese bağlı olarak kürk renginde koyulaşma ve gözde iritasyon gözlemlendi.

Diflubenzurona subakut doz uygulaması bittikten sonra 10., 15. ve 45. günlerde sıçanlardan kan örnekleri alınarak bu hayvanlarda diflubenzuronun etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Diflubenzuron uygulaması kesildikten on gün sonra disekte edilen 2 adet sıçandan alınan kan örneğine göre asetilkolinesteraz enzim aktivitesi 234,60 u/ml ve 236,80 u/ml olarak belirlenmiştir. Onbeş gün bekletilen iki sıçandan alınan kan örneğine göre asetilkolinesteraz enzim aktivitesi 281,52 u/ml ve 286,44 u/ml olarak belirlenmiştir. 45 gün bekletilen sıçandan alınan kan örneğine göre ise enzim aktivitesi 305 u/ml ve 309,56 u/ml olarak ölçülmüştür. Yapılan tespitlere göre diflubenzuronun 45. günde hala enzimi inaktive ettiği, ancak az da olsa enzim aktivitesinde yükselme olduğu tespit edildi. Ancak kesin bir sonuç söylenmesi için deney süresinin uzatılmasına ve daha fazla ölçüm yapılmasına gerek duyulmaktadır. Bu şekilde diflubenzuronun asetilkolinesteraz ile geri dönüşümlü olarak bağlanıp bağlamadığının açığa çıkartılması olanaklı olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalara ilave olarak diflubenzuronun kronik etkisini araştırmak için 8 sıçan deneyde kullanıldı. Sıçanların içme sularına 0.08 mg/l diflubenzuron olacak şekilde 6 ay boyunca diflubenzurona maruz bırakıldı. Deneklerin bir tanesinde 140 günün sonunda mortalite gözlemlendi ve kan örneği alınamadı. 145 gün sonra başka bir denekte de gözde iritasyon, hareket etmekte zorluklar, kıl yoğunluğunda azalma ve deride kızarıklıklar tespit edildi (Şekil 4.1). Diflubenzuron ile yapılan kronik çalışmada 6. ayın sonunda sıçanlardan alınan kan örneklerinde asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin 586,5 u/ml-656,88 u/ml arasında olduğu saptandı.



Şekil 4.1 Kronik maruziyet sonucu 5. ayın sonunda sıçanın morfolojik görüntüsü

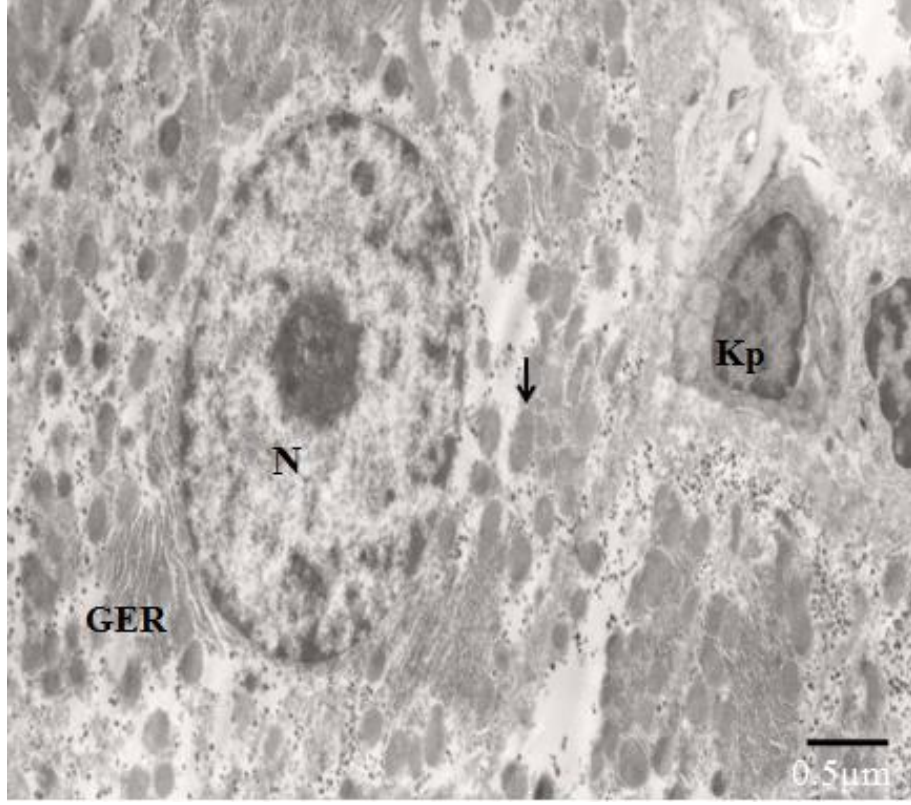
Alınan sonuçlara göre düşük dozda kronik olarak diflubenzurona maruz bırakılmış sıçanların enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre bir değişim olmadığı gözlemlendi. Deney boyunca kullanılan tüm sıçanlarda kıl yoğunluğunda azalma ve ortalama 100 ile 150 gr arasında kilo kaybı görüldü.

## **4.2 Diflubenzuronun Karaciğer Histolojisine Etkisi**

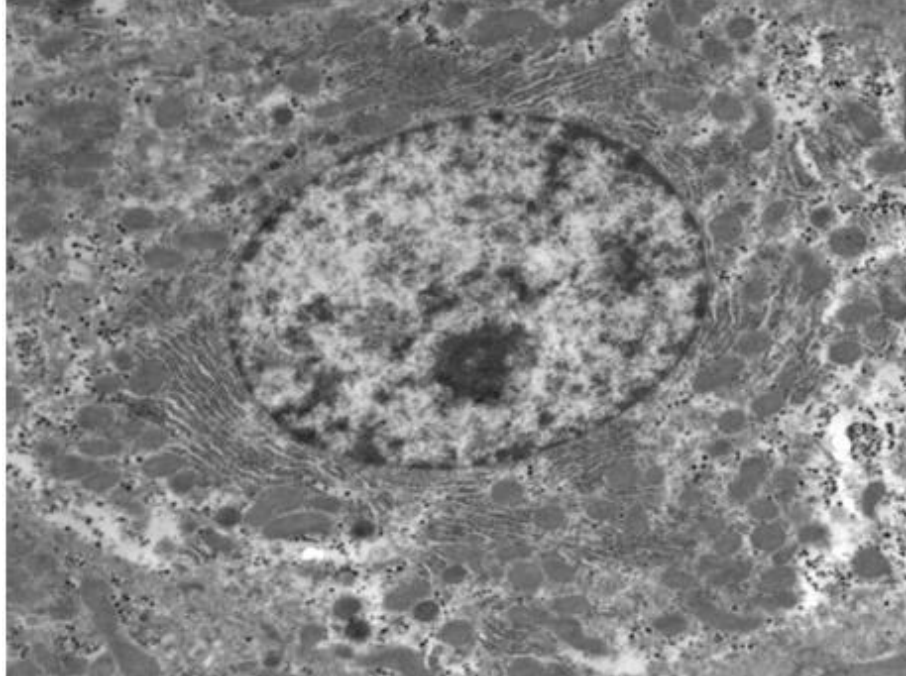
Yapılan tez çalışmasında diflubenzuronun karaciğer histolojisine etkisini kontrol grubu ve diflubenzuron uygulamalı sıçanlarda incelendi.

### **4.2.1 Grup: Kontrol grubu**

Deneylerde kontrol grubu sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde hücrelerin normal bir yapıda olduğu gözlemlendi. Hepatositlerde çekirdeğin yuvarlak şekilli olarak hücrenin ortasında bulunduğu hücrenin sitoplazmasında ise granüllü endoplazmik retikulum keseleri ve mitokondrilerin çekirdeğin etrafında yerleştiği, sinüzoidal alanda ise Kupffer hücresinin bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.2-4.3).



Şekil 4.2 Kontrol grubu sıçan karaciğeri. Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER), Mitokondri (↗), Nukleus (N), sinuzoidal alanda Kupffer Hücresi (Kp)



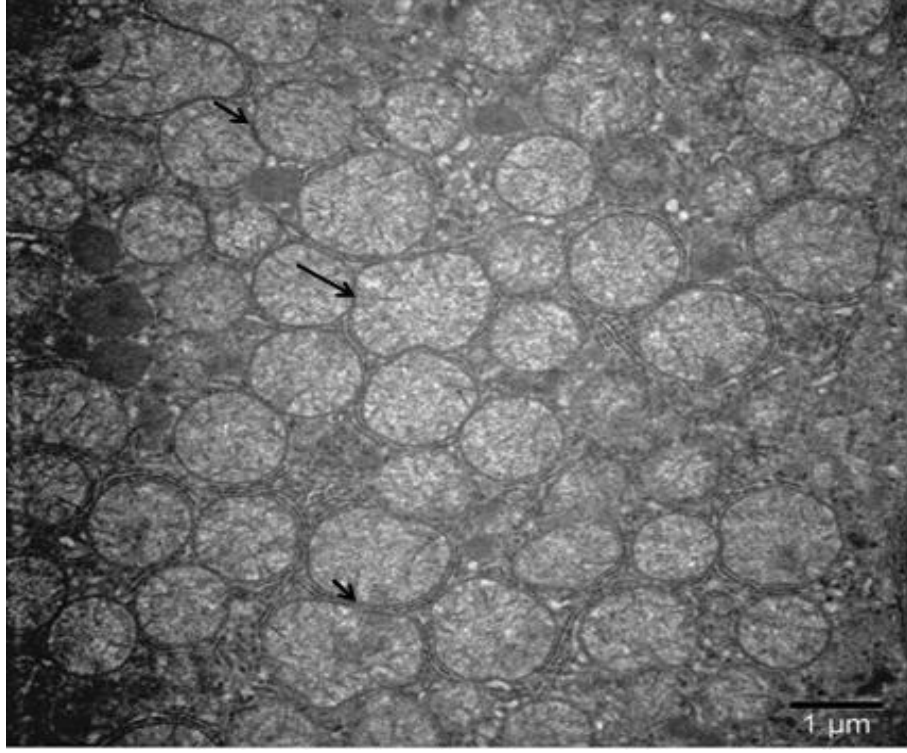
Şekil 4.3 Kontrol grubu sıçan karaciğer hepatositinin genel görünüşü

#### **4.2.2 Grup: Subakut dozda diflubenzurona maruz bırakılmış deneklerin karaciğer histolojisi**

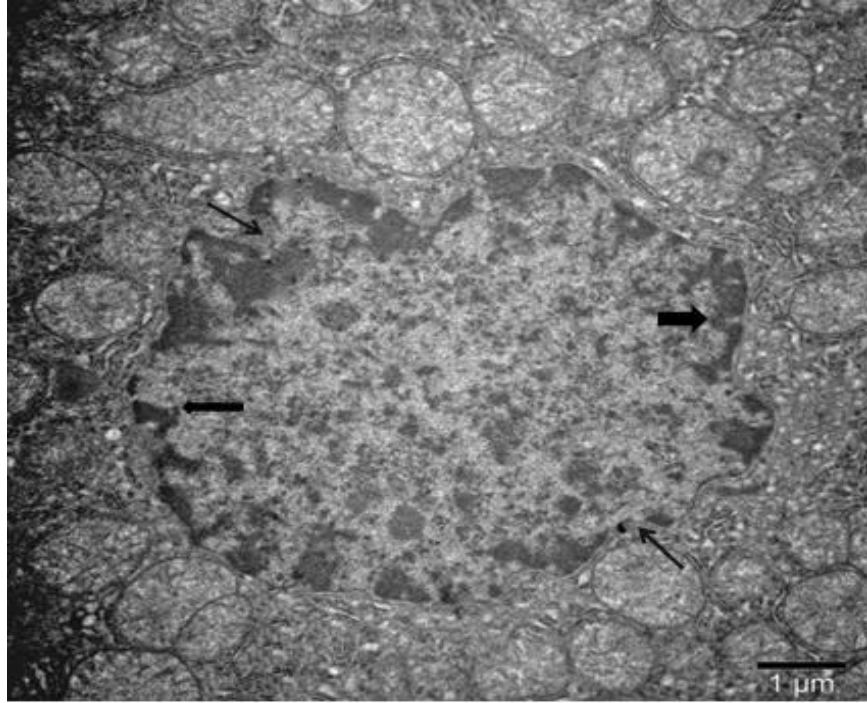
Deneyleerde subakut doz (25 mg/hafta) diflubenzurona maruziyet 10 gün süre ile uygulanmıştır. Alınan karaciğer örneklerinin sitoplazmalarında diflubenzuronun etkisiyle mitokondrilerin genişleyip birbiriyle temas ettikleri ve birbirine baskı yapıp şekil değişikliği gösterdikleri Geçirmeli Elektron Mikroskobunda gözlemlendi (Şekil 4.4). Mitokondrilerin aralarında düz endoplazmik retikulumların yoğun olduğu saptandı.

Kontrol grubu sıçanların karaciğer dokusundan alınan kesitlerde hepatosit çekirdeklerinin yuvarlak şekilli olduğu gözlemlendi. Ancak subakut dozda diflubenzurona maruz bırakılan sıçanların karaciğer hepatositlerinin çekirdeklerinde invaginasyonların (girintili-çıkıntılı) olduğu ve çekirdek nükleoplazmasında nukleus zarına yakın bölgelerde kromatin materyalinin yerleştiği saptandı. Çekirdek etrafına yerleşen mitokondrilerin irili ufaklı şekle sahip olduğu ve hacimce genişlemiş olan mitokondrilerin birbirine temas ettiği gözlemlendi (Şekil 4.5). Diflubenzuronun subakut etkisi nedeniyle hepatositin kromatin materyalinin tamamen çözündüğü ve çekirdek morfolojisinin yuvarlak şekilden girintili çıkıntılı 'S' şeklindeki bir yapıya dönüştüğü tespit edildi. Ayrıca çekirdeğin etrafındaki mitokondrilerin ise irili ufaklı şekillere sahip olduğu ve birbiriyle yakın temasta buldukları gözlemlendi (Şekil 4.6).

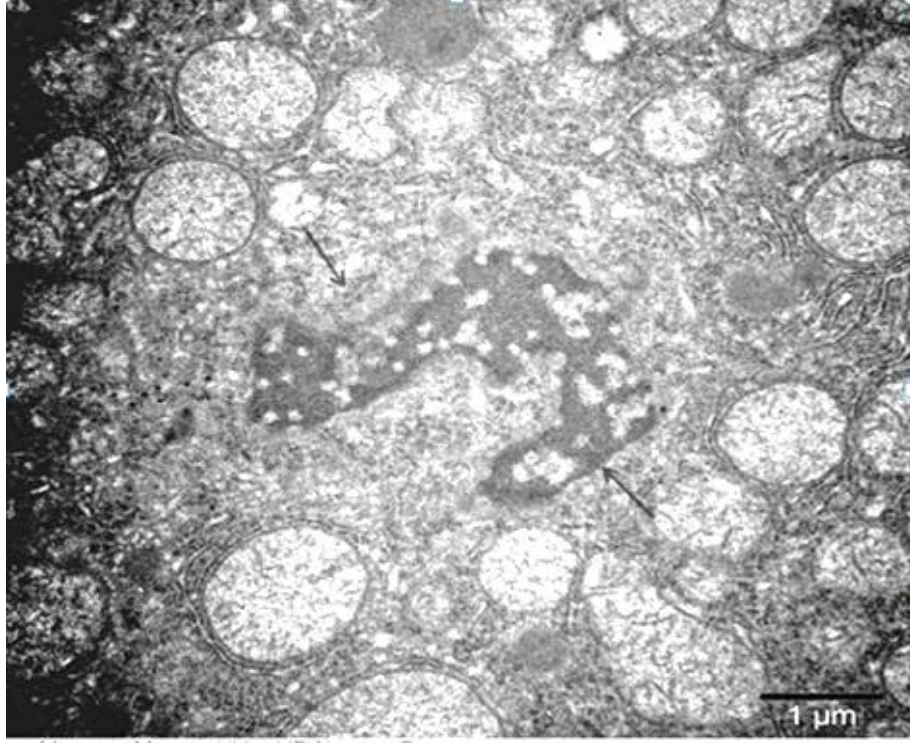
Subakut dozda diflubenzurona maruz bırakılmış sıçanların karaciğerindeki sinüzoidal alanda birçok hücreye (eritrositler, Kupffer hücresi) ve buna ilave olarak hücresel artıklar ile yoğun madde birikimine rastlandı (Şekil 4.7). Bazı Kupffer hücrelerinde ise lizozomların çok sayıda olduğu dikkat çekti (Şekil 4.8).



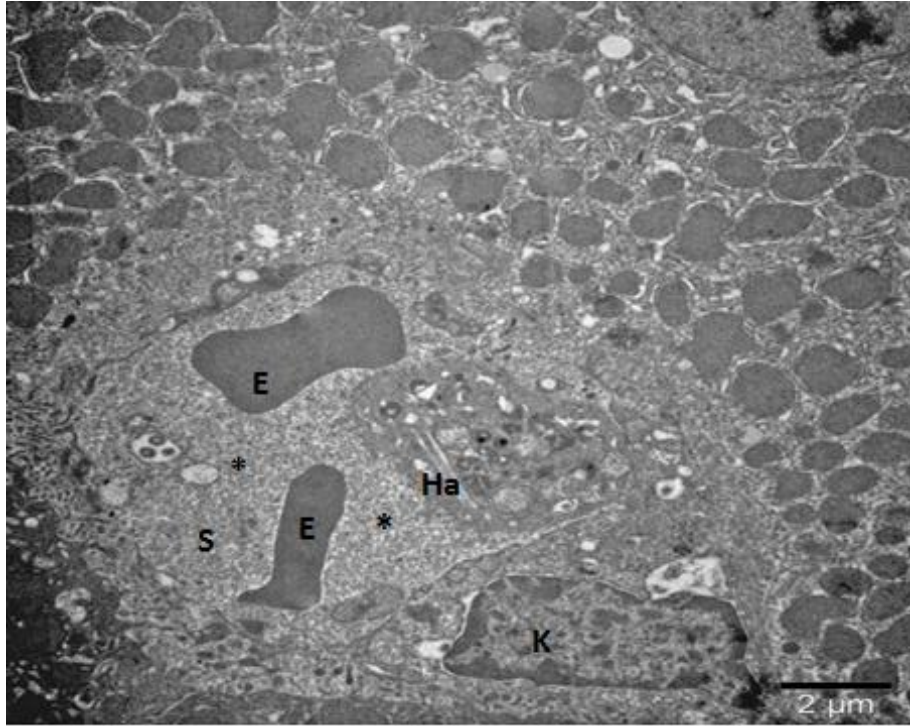
Şekil 4.4 Hepatosit mitokondri kristalarında bozunma ve düz endoplazmik retikulum keseleri (↗)



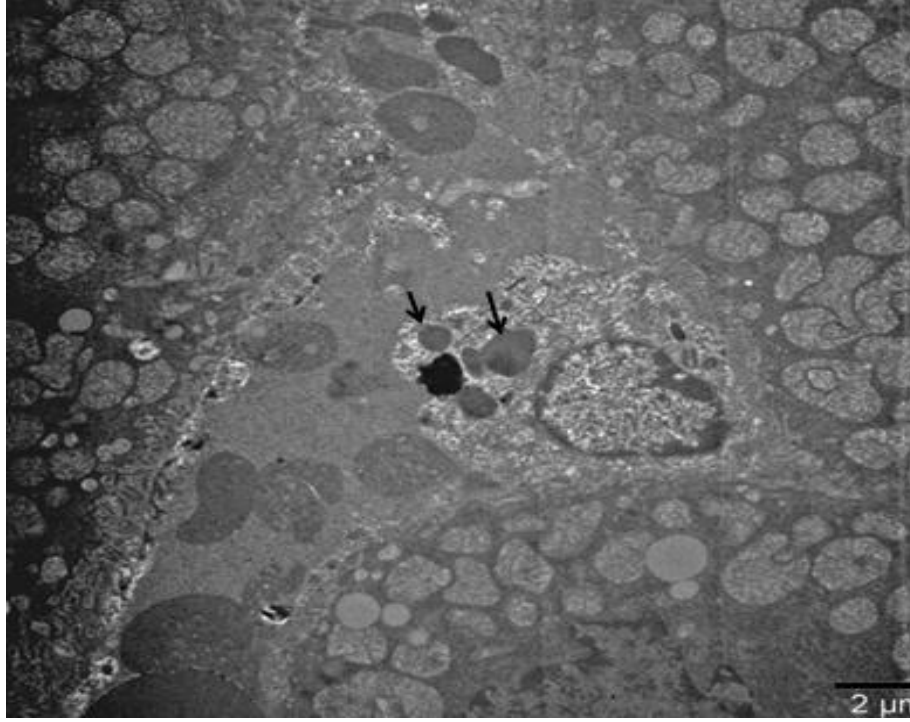
Şekil 4.5 Hepatosit hücrelerinin çekirdeklerinde invaginasyon (↗) ve çekirdek zarına yakın bölgelerde kromatin yığılıları (➡)



Şekil 4.6 Kromatin materyali çözülmüş (↘) ve şekil değişikliğine uğramış hepatosit çekirdeği. Ayrıca mitokondrilerde şişme ve kristalarda erime



Şekil 4.7 Sinüzoidal alandaki (S) hücreler, hüresel artık (Ha) ve yoğun madde birikimi (\*), Eritrosit (E), Kupffer Hücresi (Kp)



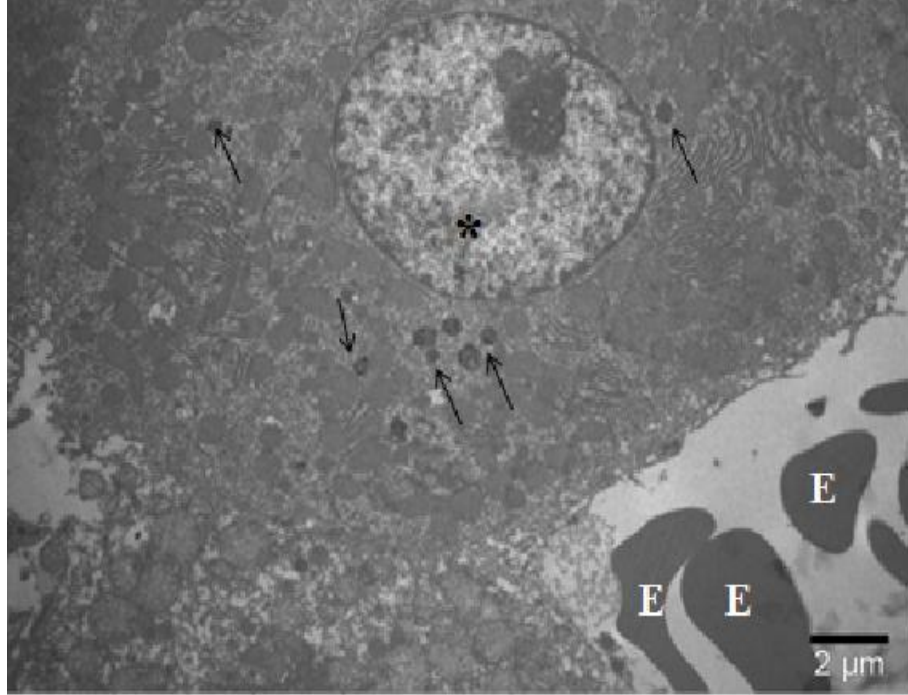
Şekil 4.8 Subakut dozda diflubenzuron uygulanmış karaciğer örneğindeki Kupffer Hücrelerinde (Kp) lizozomların (L) bulunuşu

#### **4.2.3 Grup: Subakut doza maruziyetten 5 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi**

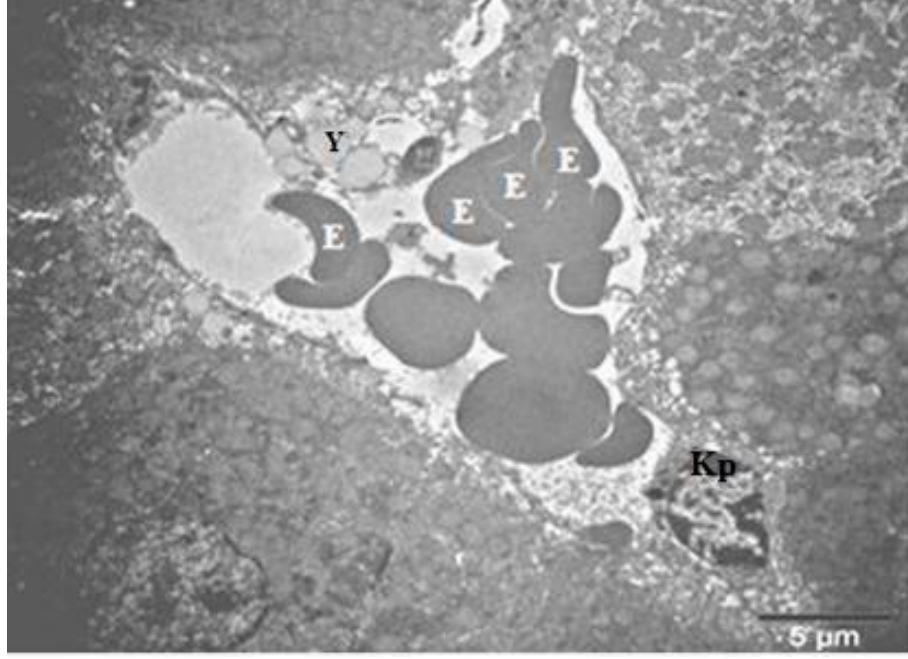
Yapılan çalışmada karaciğerin rejenerasyon özelliği düşünülerek, diflubenzuronun karaciğer dokusunda etkisinin geçici olup olmadığını incelemek için 25 mg/hafta diflubenzurona maruz bırakılan sıçanlar beş gün boyunca normal diyetle beslendi ve doku örnekleri alındı. Alınan doku örneklerinde ilk göze çarpan, sinüzoidte kanamanın belirtisi olarak düşünülen eritrositlerin bol sayıda bulunmasıydı. Hepatosit hücrelerinde çekirdek kromatin materyalinin çözüldüğü ve hücrenin sitoplazmasında elektronca yoğun granüllerin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.9).

Subakut maruziyetten 5 gün sonraki karaciğer örneğinin sinüzoidal alanında bol sayıda irili ufaklı ve şekil değişikliğine uğramış eritrositlere, az sayıda yağ damlacıkları Kupffer hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.10- 4.11).

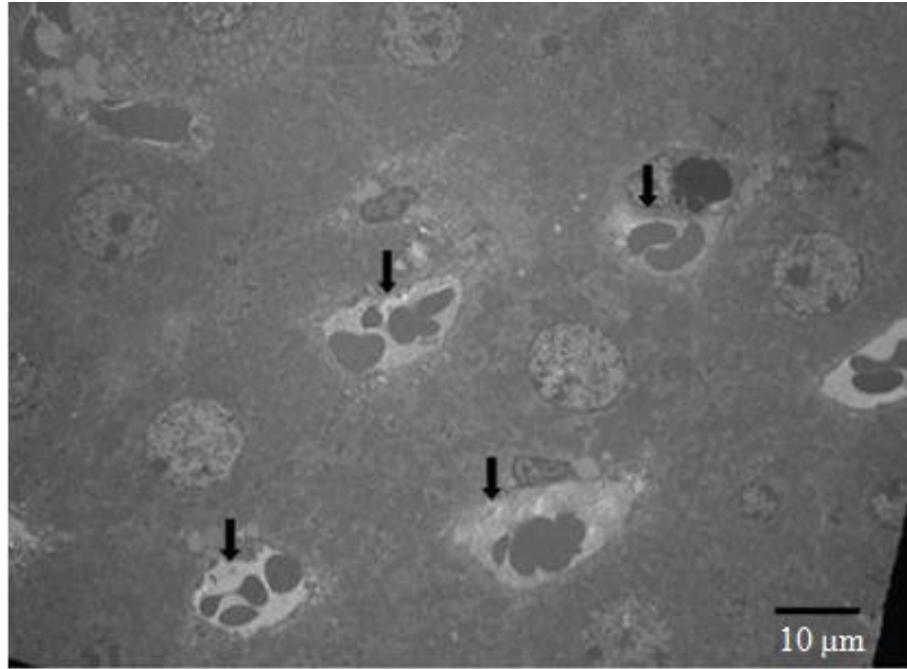
Subakut doz uygulaması süresinden 5 gün karaciğer hepatositlerinin normal bir yapıda olduğu ve sitoplazmalarında bol sayıda mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulum keseleri gözlemlendi. Hücrede GER keselerinin fazla sayıda olması hücrenin kendini onarmak için gerekli olan protein moleküllerinin sentezlenmesi nedeniyle olabilir. Bu hücrenin çekirdeğinin yuvarlak şekilli olduğu ve kromatin materyalinin homojen olarak yerleştiği tespit edildi (Şekil 4.12).



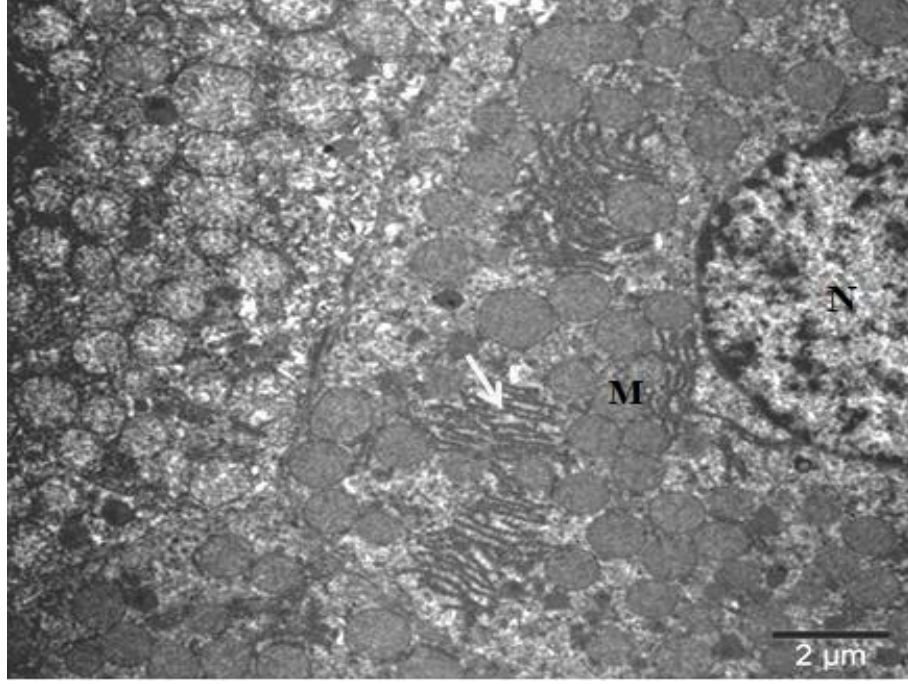
Şekil 4.9 Sitoplazmasında bol sayıda lizozom içeren ve çekirdeğinde kromatin materyalinin erimiş olduğu hepatosit ve sinüzoidlerde anormal şekilli eritrositler (E), Lizozom (↖), Çekirdekte çözülmüş kromatin materyali (\*)



Şekil 4.10 Karaciğer sinüzoidindeki yağ damlacıkları, anormal şekilli eritrositler ve Kupffer hücresi. Eritrosit (E), Kupffer hücresi (Kp) ve yağ damlaları (Y)



Şekil 4.11 Subakut doz uygulamasından 5 gün sonra alınan karaciğerin genel görüntüsü. Sinüzoidal alanlar (↓)



Şekil 4.12 Subakut dozdan 5 gün sonra normal hücre yapısına sahip hepatositteki GER keseleri (beyaz ok), Mitokondri (M), Nukleus (N)

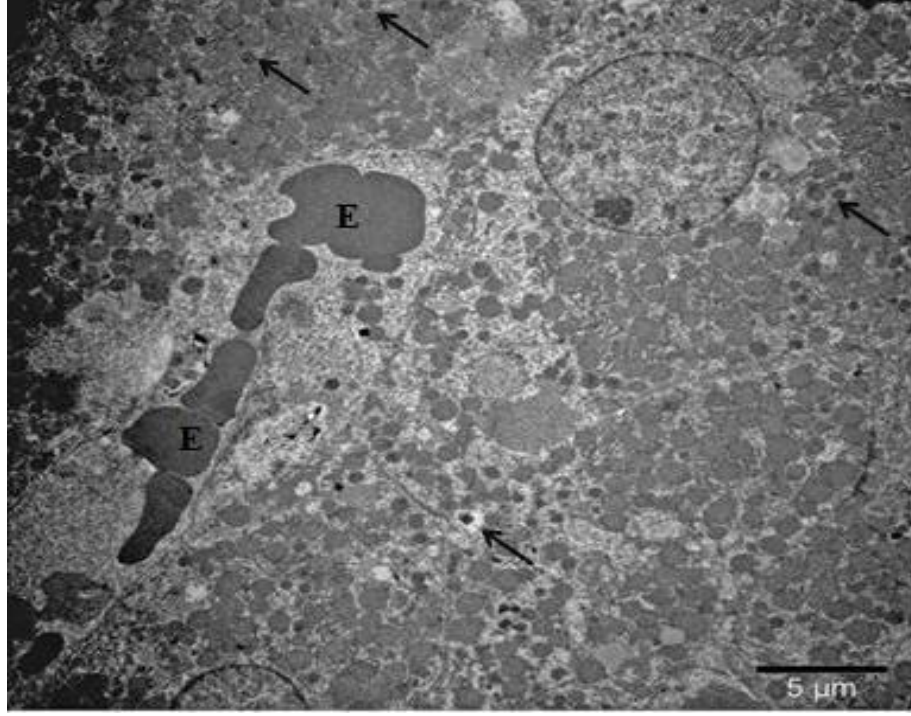
#### 4.2.4 Grup: Subakut doz süresinden 10 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi

Subakut dozda (25 mg/hafta) diflubenzurona maruz kalan sıçanlardan uygulama bittikten on gün sonra karaciğer örnekleri alındı ve elektron mikroskobunda incelendi. Yapılan gözlemlerde 5 günlüğe göre sinüzoidal alanlarda daha az sayıda eritrositlerin olduğu ve hepatositlerde bol sayıda lizozom bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).

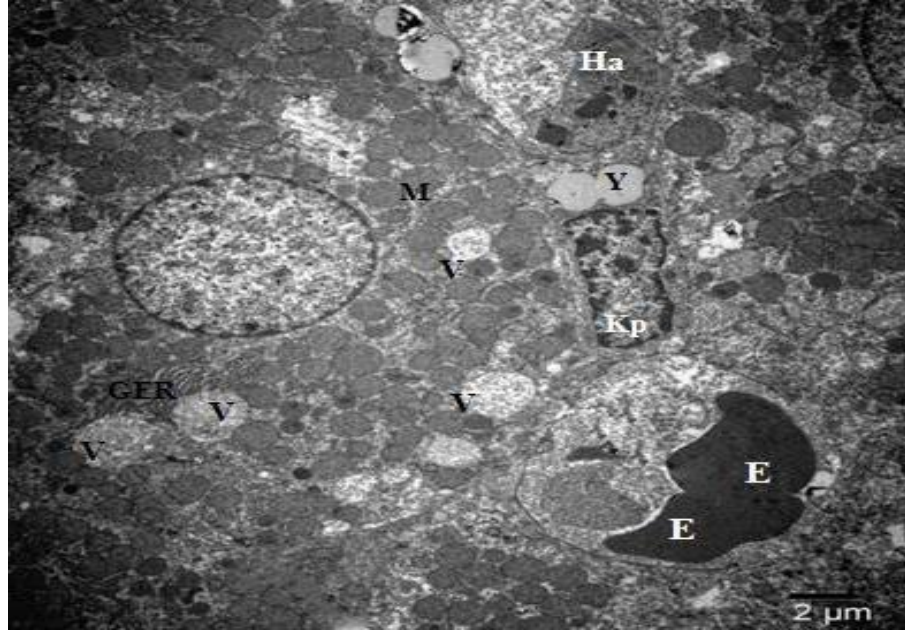
Subakut süresinden 10 gün sonra alınan karaciğer örneklerinde hepatositlerin normal çekirdek morfolojisine sahip olduğu ve bu hücrelerde düzgün yapılu mitokondriler, endoplazmik retikulum keseleri ve vakuoller gözlemlendi. Sinüzoidlerde ise hücresel artıklar yağ damlları ve Kupffer hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.14).

Diflubenzuron etkisinin ortadan kaldırılmasından 10 gün sonra alınan karaciğer örneklerindeki hepatositlerin sitoplazmalarında normal morfolojiye sahip mitokondriler

ve fagositik vakuoller gözlemlendi. Sinuzoidal alanda sekonder lizozomları olan Kupffer hücresi ve alanda hücrel artıklar dikkat çekti. Kupffer hücrelerinde sekonder lizozomların bulunması hücrel artıkların ve zararlı moleküllerin sindirilmesi nedeniyle olabilir (Şekil 4.15).

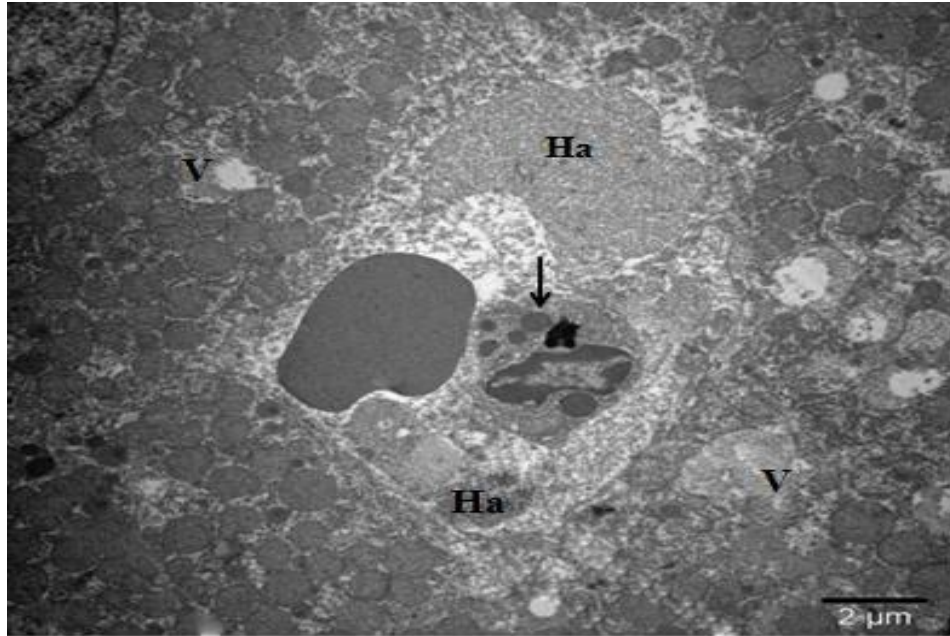


Şekil 4.13 Normal çekirdek (N) yapısına sahip hepatositin sitoplazmasındaki lizozomlar (↖) ve sinuzoidteki eritrositler (E)



Şekil 4.14 Subakut doz sonrası 10 gün normal diyetle beslenen sıçanların karaciğer örneği

GER: Granüllü Endoplazmik Retikulum, M: Mitokondriler, V: Vakuol, K: Kupffer hücresi, E: Eritrositler, Y: yağ damlacıkları ,Ha: Hüresel artık



Şekil 4.15 Kupffer hücrelerinde belirgin sekonder lizozom (↗)

Ha: Sinüzoidal alanda hüresel artıklar ,  
V: Vakuol

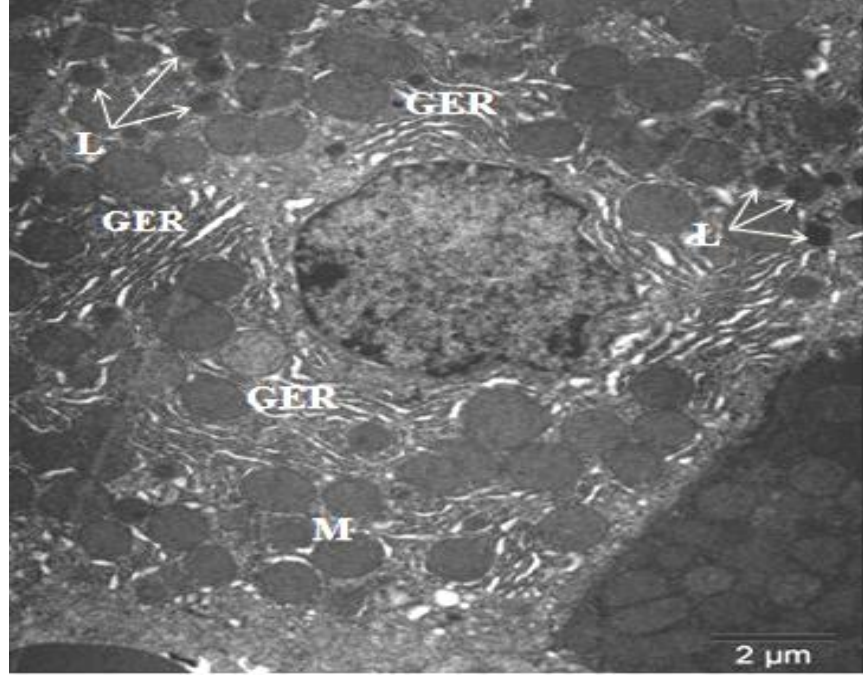
#### 4.2.5 Grup: Subakut doza maruziyetten 15 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi

Deney hayvanlarına diflubenzuronun subakut doz süresinden 15 gün sonra sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde sinüzoidal alanlarda az sayıda eritrosit az sayıda eritrosit gözlemlendi. Hepatositlerin ise normal yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.16).

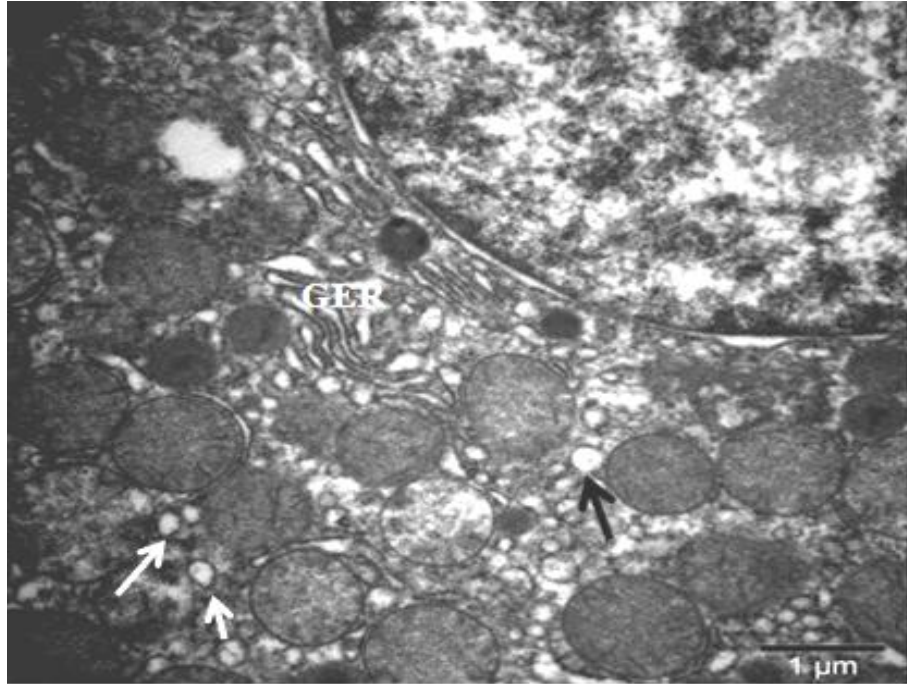
Hepatositte normal yuvarlak şekilli çekirdek morfolojisine ilave olarak çekirdeğin etrafında GER keseleri ve mitokondriler gözlemlendi. GER keselerinin protein sentezine bağlı olarak genişlediği tespit edildi. Aynı hücrede bol sayıdaki lizozomun diflubenzuronun toksik etkisini ortadan kaldırmak için fonksiyon gösterdiği düşünüldü (Şekil 4.17). Bazı hepatositlerde GER, DER ve bunların arasında mitokondrilerin düzenli şekilde yerleştiği ve normal hücre görüntüsü gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.16 Sinüzoidlerde az sayıda eritrositler (E)



Şekil 4.17 Subakut doz sonrası 10 gün normal diyetle beslenmiş sıçanın karaciğer hepatositinde genişlemiş GER keseleri, lizozomlar (L) ve mitokondriler (M)

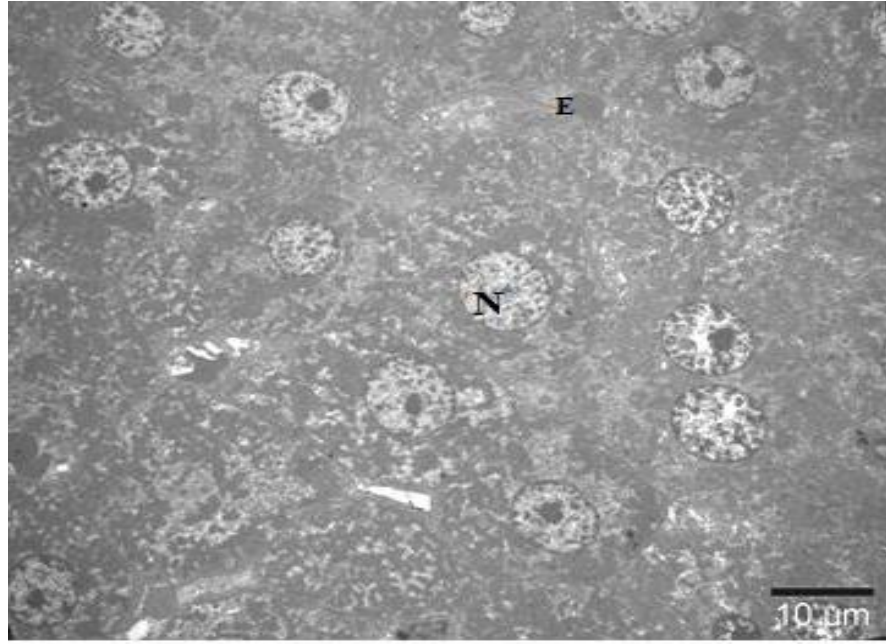


Şekil 4.18 Hepatositte genişlemiş GER keseleri ve DER keselerinin arasındaki mitokondriler

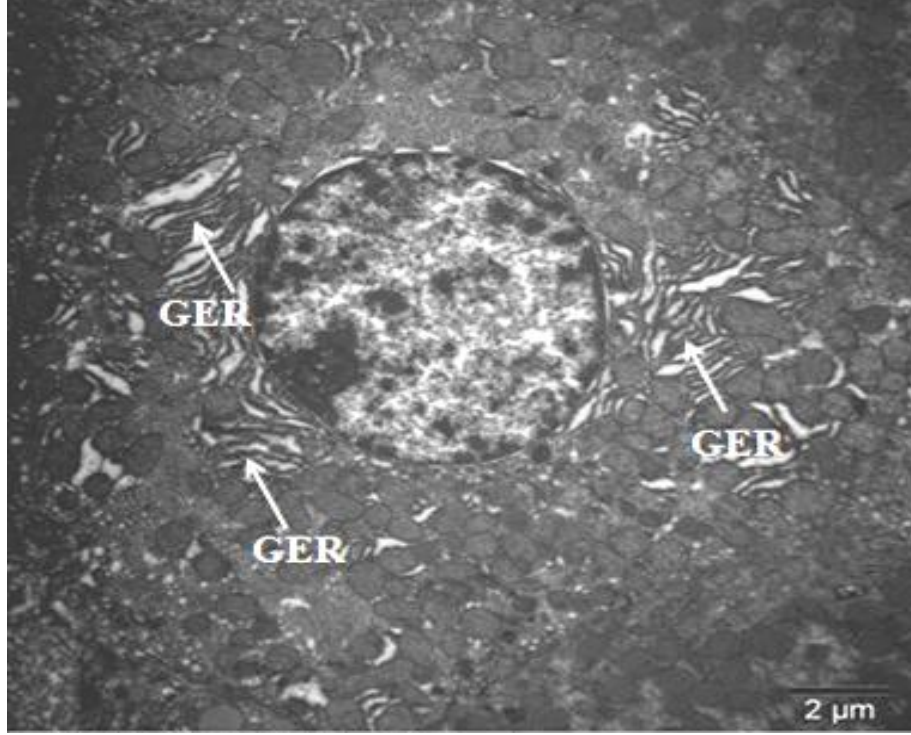
#### 4.2.6 Grup: Subakut doza maruziyetten 45 gün sonra diflubenzuronun karaciğer histolojisi üzerine etkisi

Diflubenzuronun subakut doz süresinden 45 gün sonra sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin diflubenzuronun etkisinden tamamen kurtulduğu ışınal olarak yerleştiği ve poligonal şekle sahip olduğu gözlemlendi. Bu hepatositlerin normal hücrelerdeki gibi çekirdek ve organellere sahip olduğu elektron mikroskopunda gözlemlendi (Şekil 4.19).

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemede bazı hücrelerin sentez faaliyeti içinde olduğu bol sayıdaki GER keseleri ve bu keselerin genişlemesine bağlı olarak düşünüldü (Şekil 4.20).



Şekil 4.19 Diflubenzuron maruziyeti bittikten 45 gün sonra karaciğer hepatosit hücrelerinin düzgün sıralanmış ve hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi. Nükleus (N), Eritrosit (E)



Şekil 4.20 Aktif bir karaciğer hepatositinde bol sayıda Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) keseleri ve bu keselerin genişlemesi

#### 4.2.7 Grup: Diflubenzuronun kronik dozunun karaciğer histolojisi üzerine etkisi

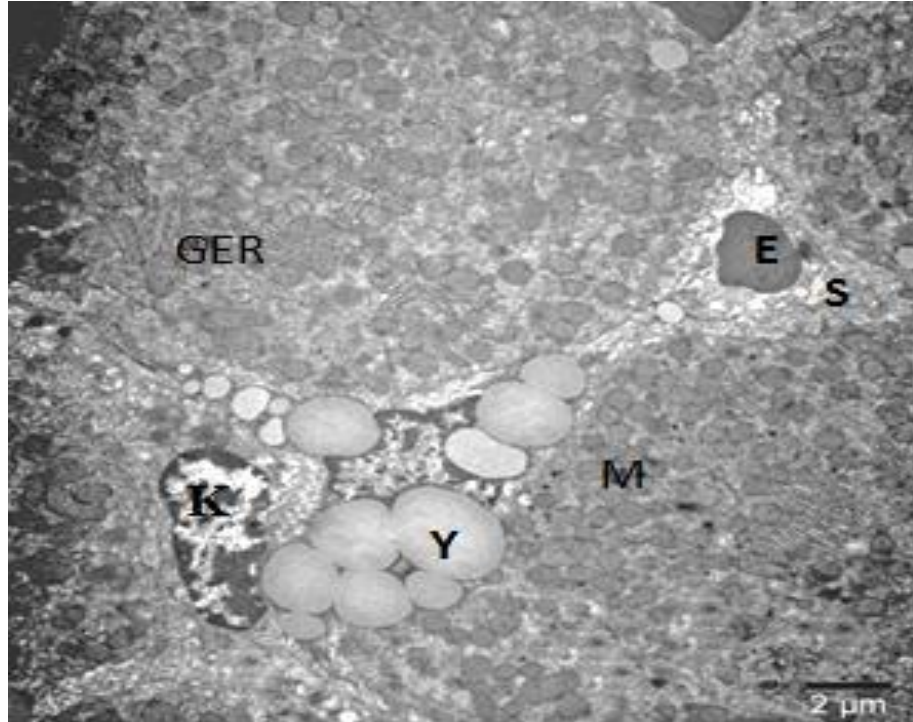
Diflubenzuronun kronik etkisini gözlemek amacıyla 6 ay boyunca sıçanların içme sularına diflubenzuron uygulandı ve bu sürenin sonunda sıçanlardan karaciğer dokuları alındı. Bu karaciğer dokuları elektron mikroskopunda incelendiğinde hepatositlerinde mitokondri ve GER keselerinin fazla sayıda olduğu tespit edildi. Sinüzoidal alanlarda diflubenzuronun toksik etkisine bağlı olabileceği düşünülen yağ damlacıklarının arttığı gözlemlendi. Yağ damlacıklarının arasında Kupffer hücrelerinin kaldığı ve bu yağ damlacıklarını Kupffer hücrelerinin fagosite ettiği tespit edildi (Şekil 4.21).

Kronik dozda diflubenzurona maruz kalmış sıçanların karaciğer dokularından alınan kesitlerde karaciğerin genel görüntüsünde sinüzoidal alanlarda Kupffer hücreleri ile anormal şekilli eritrositler gözlemlendi (Şekil 4.22). Yine bu alanlarda Kupffer hücresi ve granüllü lökositlerden nötrofil hücrelerine rastlanıldı. Her iki hücrenin fagositoz yaptığı

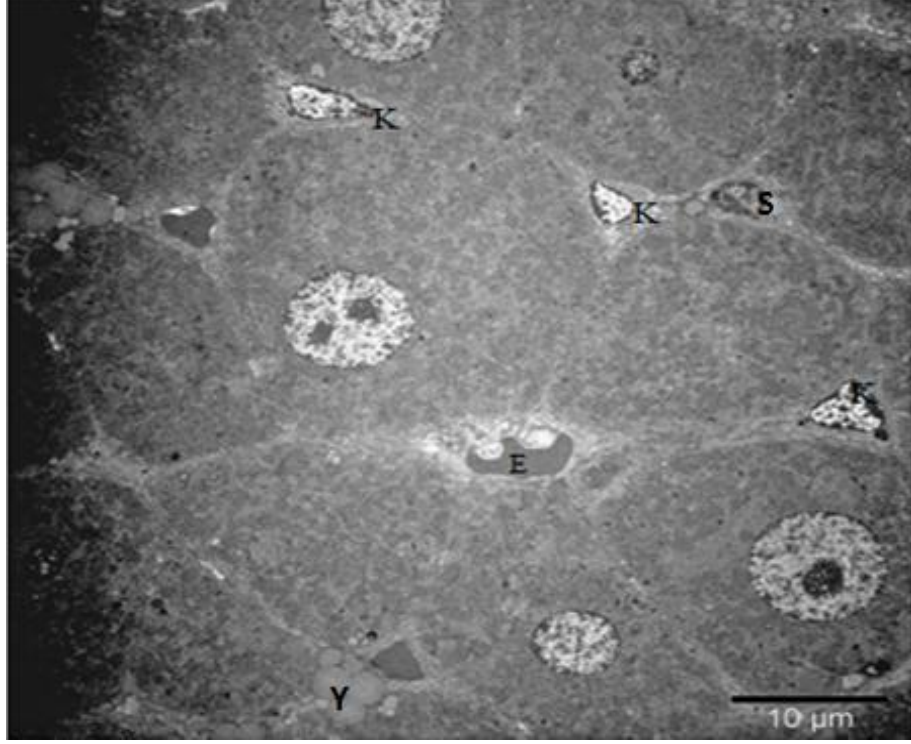
düşünülecek olursa difluebnzurona karşı hücrelerin iş birliği içinde olduğu düşünülebilir (Şekil 4.23).

Diflubenzuronun toksik etkisini ortadan kaldırmak için hücrelerin faaliyette olduğu gözlemlendi. Çünkü sinüzoidteki Kupffer hücrelerinde lizozom artışı hepatositlerde ise GER keselerinin fazla sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.24).

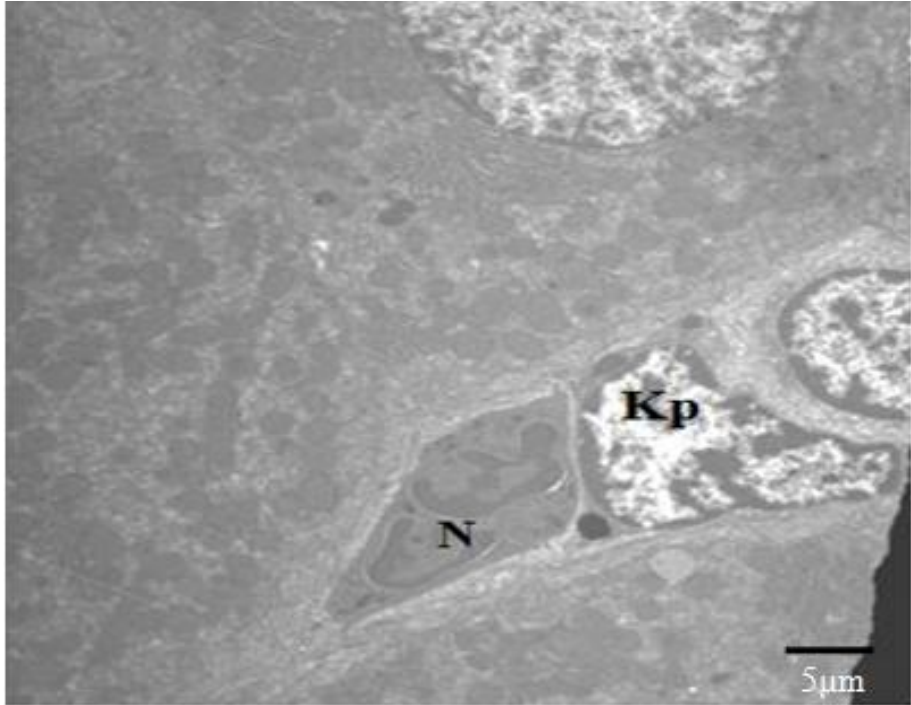
Bir başka karaciğer örneğinde sinüzoidlerinde yağ damlacıklarının artışı, kaynaştığı ve bu yağ damlacıklarının arasında Kupffer hücrelerinin kaldığı gözlemlendi. Hepatositlerde ise nükleuslardaki kromatin materyalinin çekirdek zarına yakın bölgelerde yerleştiği gözlemlendi. Ayrıca yağ damlacıklarının birbiriyle kaynaştığı tespit edildi. Hepatositlerin nükleuslarında zarlara yakın yerlerde kromatin yığınları gözlemlendi (Şekil 4.25).



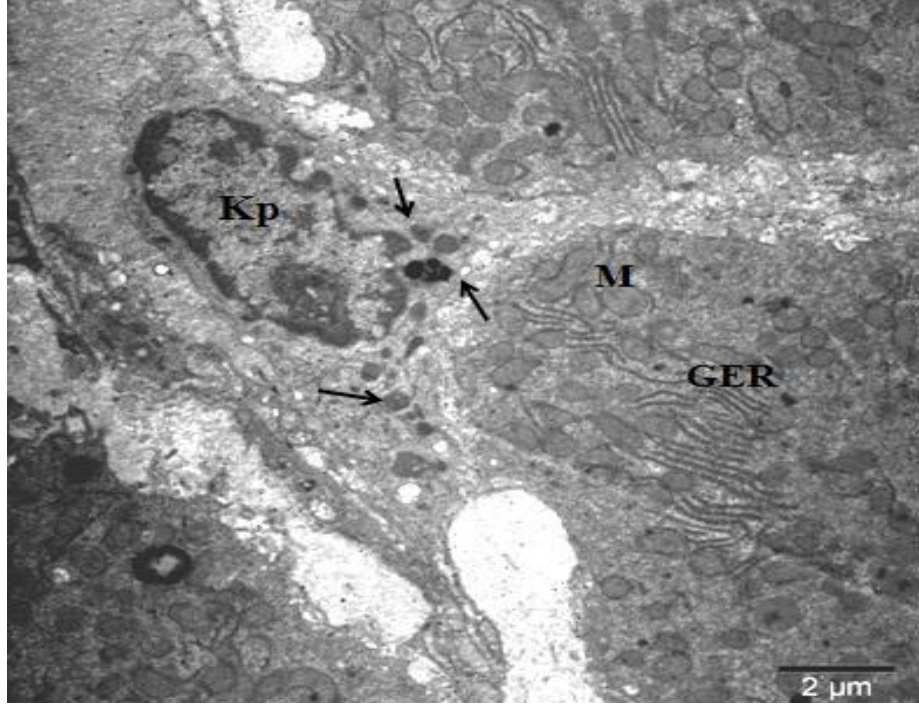
Şekil 4.21 Kronik olarak diflubenzurona maruz kalmış sıçan karaciğerindeki hepatositlerde bulunan Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER), Mitokondri (M) ve sinüzoid (S) içindeki Kupffer hücreleri (K) ile Yağ damlacıkları (Y)



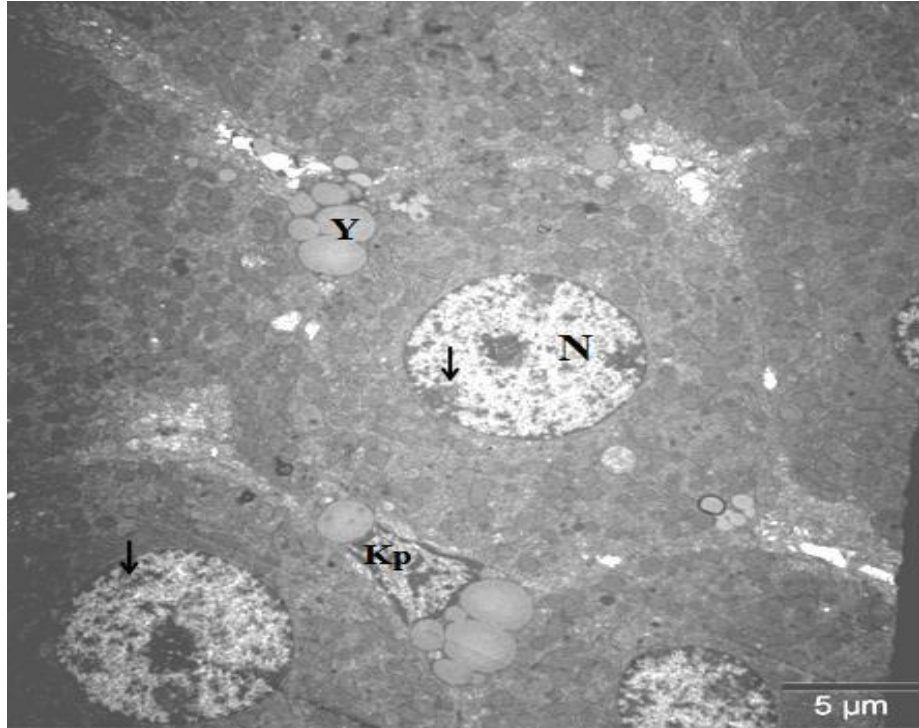
Şekil 4.22 Sinüzoidal alanlarda(S) Kupffer Hücreleri (K), şekil değişikliğine uğramış eritrosit (E) ve Yağ damlacıkları (Y)



Şekil 4.23 Hepatositler ve sinüzoidteki Kupffer hücresi (K) ve Nötrofil (N)



Şekil 4.24 Kronik olarak uygulanan diflubenzuron nedeniyle Kupffer hücresinde (Kp) lizozom artışı (→) ve hepatositlerde Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) keseleri



Şekil 4.25 Kronik dozda diflubenzurondan etkilenmiş sıçan karaciğerindeki sinuzoidlerde yağ artışı (Y) ve hepatositlerin nukleuslarında kromatin yığınları (→). Kupffer Hücresi (Kp), nukleus (N)

Sonuç olarak; sıçanlarda diflubenzuronun subakut dozu uygulandığında karaciğer hepatositlerinin çekirdeklerinde belirgin çöküntüler (invaginasyon) ve sitoplâzmalarında mitokondri ve GER keselerinin bol sayıda olduğu gözlemlendi. Sinüzoidal alanlarda ise bol sayıda Kupffer hücrelerine ve eritrositlere rastlandı. Diflubenzuronun kronik etkisi nedeniyle karaciğer hepatositlerinin çekirdeklerinde invaginasyon gözlenmedi ancak mitokondri ve GER keselerinin bol sayıda olduğu saptandı. Diflubenzurona maruz kalan bütün gruptaki sıçanların enzim aktivitesi ile karaciğer dokusundaki harabiyetin paralel olduğu gözlemlendi.

## 5.TARTIŞMA

Son zamanlarda sivrisinek larvaları ile mücadelede en çok kullanılan insektisitlerden birisi diflubenzuron'dur (Miguel vd. 2013). Yapılan bu tez çalışmasında diflubenzuronun kontrol grubuna göre subakut dozunun asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde yaklaşık % 43 oranında azalma saptanmıştır. Kronik dozda ise kontrol grubuna göre asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde bir değişim saptanmadı. Subakut doz maruziyetin kesilmesiyle birlikte 45. günden sonra az da olsa AChE aktivitesinde artış gözlenmiştir. Sıçanlara kronik olarak içme sularına uyguladığımız diflubenzuron dozu, (LD<sub>50</sub> 4,64 mg/kg) dozunun çok altında (0,08 mg/l) olduğu için AChE enzim aktivitesinde (586,5 u/ml - 656,88 u/ml) bir değişiklik olmadığı düşünülmektedir.

Diflubenzuronun AChE enzimine bağlanma ve inhibisyon mekanizmasını ortaya koymak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Begum vd. (1987), tarla faresi (*Mus boodugo*)'nin beyin asetilkolinesteraz enzimine bir insektisit olan dieldrinin etkisini incelemişlerdir. Dieldrin muameleli fare beynindeki AChE enziminin aktivasyonun azaldığını rapor etmişlerdir. Dieldrinin asetilkolin-asetilkolinesteraz ikili sistemini bozduğu, kolinesteraz enzimini inhibe ederek asetilkolinesteraz enziminin potansiyel aktivitesini düşürdüğü ve bu nedenle nörotoksik bir bileşik olduğu belirtilmiştir. Bizim yaptığımız yüksek lisans tez çalışmasını Wistar Albino sıçanlara (*Rattus norvegicus*) diflubenzuronun kronik ve subakut etkisi çalışılmış ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesini düşürdüğü gözlemlendi.

Maduenho vd. (2008), diflubenzuronun tatlı su balığı *Prochilodus lineatus*'a akut etkisini çalışmışlardır. Yapılan çalışmada diflubenzuronun kas AChE aktivitesine etkisi, detoksifikasyon ve antioksidant enzimlerine etkisi, hematolojik ve fizyolojik parametrelere etkisi ve karaciğer histopatolojisini incelemişlerdir. Diflubenzurona 6, 24 ve 96 saat maruz bırakılan bütün tatlı su balıklarının kas AChE aktivitesinin düştüğünü, 96 saatin sonunda eritrosit ve hemaglobin seviyesinin düştüğü, çekirdek ve hücresel densesitenin arttığı, sitoplazma ve çekirdek dejenerasyonlarının bulunduğu rapor

edilmiştir. Ayrıca karaciğerde detoksifikasyonda görevli katalaz ve Glutatyon-S-transferaz aktivitesinde de artış olduğu öne sürülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada da subakut maruziyet sonucu sıçanların hem AChE enzim aktivitesinde düşüş hem de karaciğer hücrelerinde dejenerasyonlar tespit edilmiştir.

Diflubenzuronun da bulunduğu benzilfenilüre grubuna ait IGR insektisitlerinden biri olan flucycloxuronun bir tatlı su balığı olan sivrisinek balığının (*Gambusia affinis*) beyin dokusunda asetilkolinesteraz ve katalaz aktivitesine etki ettiği rapor edilmiştir. Flucycloxurona 7, 14, 21 gün süre maruz bırakılan sivrisinek balığının beyin dokusundaki AChE enzim aktivitesi ölçülmüş ve önemli düşüş saptanmıştır. Araştırmacılar (Zaidi ve Soltani 2010), yaptıkları deneyler sonunda AChE aktivitesinde LC<sub>50</sub> için %44 ve LC<sub>90</sub> için %55 düşüş (inhibisyon) belirtmişlerdir. Zaidi ve Soltani'nin yaptığı çalışmaya benzer olarak yapılan yüksek lisans tez çalışmasında, diflubenzuronun subakut etkisinin sıçan kan serum asetilkolinesteraz aktivitesinde yaklaşık %43 oranında azalma tespit edilmiştir.

Genel olarak pestisit zehirlenmesi belirteci olarak asetilkolinesteraz enzim aktivitesindeki azalma dikkate alınmaktadır (Demirdöğen 2010). Yaptığımız çalışmada diflubenzuronun subakut uygulamasında karaciğer dokusunda oluşan harabiyet ile asetilkolinesteraz enzim aktivitesi arasında orantılı bir ilişki gözlemlendi. Ancak kronik maruziyet sonucu karaciğer dokusunda oluşan harabiyet oluşurken, asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde bir azalma saptanmadı. Bu bilgiler doğrultusunda diflubenzurona kronik maruziyet sonucu zehirlenmenin asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ile tespit edilemeyeceği düşünülmektedir.

AChE dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan, lipotropik etkiye sahip ve asetilkolini hidrolizleyen nonspesifik bir enzimdir (Güven 2000). Asetilkolinesteraz, asetilkolini hidrolizleyerek asetil ve kolinin olarak parçalanmasına neden olur. Kolin, asetilkolinin yapısına katılmasına ek olarak karaciğer yağ metabolizmasında önemli etkiye sahip lipotropik bir maddedir. Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin etkisiyle AChE enzim aktivitesinin düşmesi, asetilkolinin asetil ve koline

parçalanmasında düşüşe neden olur. Dolayısıyla vucuttaki kolin miktarı normale göre daha az olabileceği söylenebilir. Kolin miktarının azalması, kolinin lipotrofik etkisinde azalmaya yol açıp karaciğerde oluşan yağ birikimini engellemesini bozar (McDwell 2000). Bu bilgiler ve elde ettiğimiz bulgular sonucunda; Karaciğer sinuzoidal alanlarındaki yağ damlacıkları bulguları asetilkolinesteraz enzim aktivitesindeki düşüşten dolayı kolin maddesinin yetersizliğine bağlı olarak lipotrofik etkinin azalmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca diflubenzuron, hücre membranında fosfolipitler ile bileşik halinde bulunan AChE enziminin aktivitesini düşürerek, hücre membranında hasara yol açacağı ve yağ damlacıklarının hücre içine alınamayıp sinuzoidal alanda birikimine neden olmasında akla gelmektedir.

Young vd. (1986), diflubenzuronun farklı dozlarının (125, 500, and 2000 mg/kg vucut ağırlığı) fare karaciğerinde üçlü glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi (S-aryl, S-aralkyl, and S-epoxide) ve doku hasarına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan çalışmada artan dozlarda glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesinde yükselme tespit edilmiş ve karaciğer hepatositlerinde mitokondri organelinde artış, şişme ve matriks yoğunluğunda azalma, düz endoplazmik retikulum ve granüllü endoplazmik retikulum organellerinin sayısında artış gözlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre diflubenzurona subakut doz ve subakut doz sonrası 5, 10 ve 15. günlerdeki karaciğer hepatositlerinin bol sayıda DER, GER ve mitokondri organellerini içerdiği tespit edildi. Ayrıca hepatositlerde Kupffer hücreleri, yağ damlaları ve eritrositlere rastlandı. Elde edilen sonuçlara göre hücrede oluşan hasarın hücrede normalden fazla salgılanan enzimlerden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Endotelyan hücre tabakası altında ve disse aralığında yer alan yağ depolayan hücre olarakta isimlendirilen İTO hücreleri bulunmaktadır. Bu hücreler A vitaminince zengin lipid çözeltileri depolamaktadır (Junquera 1998, Temel vd. 2002). Elektron mikroskobu ile karaciğer dokularından elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda kronik olarak diflubenzurona maruz kalan sıçanların sinuzoidal alanlarında, subakut maruziyet ortadan kaldırıldıktan 5 gün sonra sıçanlardan alınan karaciğer dokularında ise disse aralığında yağ damlacıkları tespit edildi. Bu alanlarda bulunan yağ damlacıklarının

diflubenzuronun karaciğer dokusunda oluşturduğu histopatolojik etkisinin bir sonucu olarak ito hücrelerinin hasar görmüş olmasından kaynaklandığını akla getirdi.

Histopatolojik etkisi tam olarak çalışılmamış olan diflubenzuron birincil olarak karaciğer, dalak ve eritrosit hücrelerine etki etmektedir. Atlantik Som balığında (*Salmo salar*) yapılan bir çalışmada diflubenzuronun gastrointestinal yoldan kısmen absorbe edilerek karaciğer, böbrek, beyin, safra, yağ ve kıkırdak dokularına yayıldığı büyük bir kısmının parçalanmadan safrada bulunduğu bildirilmiştir (Anonymous 1998). Diflubenzuron ve pyriproxyphene 96 saat boyunca maruz kalan *Cyrtocara moori* 'nin (Cichlidae, Teleostei) bağırsak dokusunda ülserasyon ve bağırsak dokusundaki fırçası kenar yapısında deformasyonlar gözlenmiştir (Gündüz ve Üçüncü 2013). Yapılan tez çalışmasında deney süresince deney hayvanlardaki kilo kaybının nedeni olarak diflubenzuronun etkisiyle barsaklarda hasar oluşturmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Olsvik vd. (2013), Atlantik'de Atlantik morinasına (*Gadus morhua*) ekonomik ve ekolojik olarak zararlı olan salmon biti (*Lepeophtheirus salmonis*) ile mücadelede diflubenzuron ve teflubenzuron gibi benzilfenilüre grubundan bir insektisitler kullanılmaktadır (Anonymous 2013). Araştırmacılar yaptıkları çalışmada diflubenzuronun karaciğer ve kas dokusuna etkisini ve etkinin ne kadar süre devam ettiğini gözlemlemek için Atlantik morinosuna 14 gün boyunca düşük dozda ( $3 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{d}^{-1}$ ) diflubenzuron uygulamışlar ve bunu takiben 22 gün boyunca etkiyi ortadan kaldırıp vücudun temizlenme sürecini başlatmışlardır. Karaciğer ve kas dokusundaki diflubenzuronun seviyesi HPLC analizi ile tespit edilmiştir. Deneylerin sonucunda diflubenzuron seviyesinin uygulama süresince karaciğer dokusunda artış gösterdiği, uygulama ortadan kaldırıldıktan 1 gün sonra seviyenin maksimum düzeye geldiği görülmüştür. Uygulama ortadan kaldırıldıktan 8 gün sonra 10 hayvanın sadece bir tanesinde diflubenzurona rastlanırken, 22 gün sonra hiçbir hayvanın karaciğer dokusunda diflubenzurona rastlanmamıştır. Buna benzer bulgu yaptığımız deney sonuçlarında elde edildi. Subakut olarak 10 gün boyunca 25 mg diflubenzurona maruz kalan sıçanların karaciğer hepatositlerinde mitokondri sayısında artış, hücre çekirdeğinde dejenerasyon, sinüzoidal alanda çok sayıda sekonder lizozomlara sahip Kupffer hücrelerine rastlanırken, maruziyet ortadan kaldırıldıktan 5 ve 10 gün sonrasında hasarların devam ettiği, 15.

günden sonra iyileşmenin gözleendiği ve 45. günde hepatoit hücrelerinin ışınsal doğrultuda poligonal yapıya sahip olduğu ve mitokondri ve GER keselerinin yapısal olarak düzgün olduğu tespit edildi.

Barros vd. (2014), diflubenzuronun hedef dışı canlılara etkisini araştırmak için yetişkin erkek sıçanlara 0, 2, 4 ve 8 mg/kg diflubenzuronu 28 gün boyunca uygulanmıştır. Deney gruplarında klinik bir belirti gözlenmezken, 8 mg/kg/diflubenzuron/gün diflubenzurona maruz kalan grupta serum alanin aminotransferaz enziminde yükselme saptanmıştır. En düşük dozda diflubenzurona subakut olarak maruz kalan erkek sıçanlarda testis ağırlığında, sperm üretiminde azalma gözlenirken, sperm morfolojisinde, epididimis, karaciğer ve böbrek histolojisinde bir anormallik tespit edilmemiştir. Yapılan tez çalışmada 0,08 mg/l diflubenzurona kronik olarak maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokusunda herhangi bir morfolojik bir değişim gözlenmedi, mitokondri ve granüllü endoplazmik retikulum organellerinde artış tespit edildi.

Yapılan bu tez çalışmasında diflubenzuronun subakut dozunun kan serumundaki AChE aktivitesini düşürdüğü ve histopatolojisine sebep olduğu tespit edildi. Kronik dozdaki diflubenzuronun AChE enzim aktivitesine ve karaciğer histopatolojisine sebep olmadığı anlaşıldı. Diflubenzuronun AChE enzime bağlanma mekanizmasını ortaya koymak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışmanın ileride diflubenzuron ile yapılan çalışmalara kaynak olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonymous. 1981. Pesticide Residues In Food/WHO. Geneva.
- Anonymous. 1993. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Summary of Toxicological Evaluations Performed by The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Geneva Switzerland, Sayfa, 1513–1540.
- Anonymous. 1995. Diflubenzuron Health And Safety Guide/WHO, No:99, Geneva.
- Anonymous. 1996. Data Sheets on Pesticides. Diflubenzuron No:77, Geneva.
- Anonymous. 1998. Diflubenzuron. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit, London, UK.
- Anonymous. 2008a. Pesticides, Children's Health and Environment. [www.Who.Int/Ceh](http://www.Who.Int/Ceh). 2008.
- Anonymous. 2008b. Diflubenzuron in Drinking-Water: Use for Vector Control in Drinking-Water Sources And Containers/WHO, Geneva.
- Anonymous. 2013. Increased Consumption of Therapeutic Agents İn Norwegian Aquaculture 2012. Norwegian Institute of Public Health, Oslo.
- Anonymous. Diflubenzuronun kimyasal yapısı <http://www.alanwood.net/pesticides/diflubenzuron.html>
- Adair, R.C. JR. and Mehta, N.K. 2001. Residual Effects of Micromite (Diflubenzuron) Treated Citrus Leaves on Eggs Deposited by *Diaprepes abbreviatus*. Proc. Fla. State Hort. Soc., 114, 101–106.
- Aktan T.M., Canbilen, A. ve Keklikoğlu, N. 2003. Kupffer Cells. Cerrahpaşa J Med, 34, 110-113.
- Aras K. ve Ersen G. 1992. Klinik Biyokimya. Taş Kitapçılık Ltd. şti, 338.
- Ascher, K.R.S. and Nemy, N.E. 1976. Contact Activity of Diflubenzuron Against *Spodoptera littoralis* Larvae. Pestic. Sci., 7, 447-452.
- Aytekin, Y. ve Solakoğlu, S. 2006. Temel Histoloji. 1. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 512s., İstanbul.
- Baron, R. L., Hayes, W.J. and Laws, E.R., 1991. Carbamate İnsecticides. In Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, 3–6.

- Barros, A. L., Cavalherio, G. F., Major de Souza, A. V., Traesel, G. K., Anselmo-Franci, J. A., Kassuya, C. A. L. and Arena, A. C. 2014. Subacute Toxicity Assessment of Diflubenzuron, an Insect Growth Regulator, in Adult Male Rats. *Environmental Toxicology*.
- Baruah, I. and Das, S. C. 1996. Evaluation of Methoprene (Altosid) and Diflubenzuron (Dimilin) for Control of Mosquito Breeding in Tezpur (Assam). *Indian J Malariol*, 33, 61–66.
- Bayoumi, A. E., Pérez-Pertejo, Y., Zidan, H. Z., Balaña-Fouce, R., Ordóñez, C., and Ordóñez, D. 2003. Cytotoxic Effect of Two Antimolting Insecticides in Mammalian CHO-K1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 19–23.
- Begum, J. S., Reddy, M. M., Indira K. and Swami K.S. 1987. Effect of Dieldrin on Catalytic Potential of Field Mouse *Mus booduga* Brain Acetylcholinesterase. *Archives of Toxicology*, 95 (2); 101–104.
- Bently, J. P., Weber, G. H. and Gould, D. 1978. The Effects of Diflubenzuron Feeding on Glycosaminoglycan and Sulfhemoglobin Biosynthesis in Mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 10 (2); 162–167.
- Bloom, W. and Fawcett, D. W. 1975. *A Textbook of Histology*. 1. ed., Saunders, 858s. Philadelphia, USA.
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M. and Vitalone, A. 2008. Neurotoxicology of Pesticides. A Brief Review. *Front Bioscience*, 13, 1240–1249.
- Çapkın, E. 2011. Karbasulfanın Gökkuşuğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) Eritrosit Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim Aktivitesine Etkisi. *Journal of Fisheries Sciences*, 5 (3); 240-249.
- Çetin, H. 2002. A Study Related to Mosquito (Diptera: Culicidae) Species in Antalya, Their Living Areas And Attempts to Control Them. M.Sc. Thesis. Akdeniz University, Antalya, Turkey.
- Çetin, H., Yanıkoğlu, A. ve Cilek, J. E. 2006. Efficacy Of Diflubenzuron, A Chitin Synthesis Inhibitor, Against *Culex pipiens* Larvae in Septic Tank Water. *Journal of The American Mosquito Control Association*, 22(2); 343–345.
- Dağ, S. S., Aykaç, V. T., Gündüz, A., Kantarcı, M. ve Şişman, N. 2000. Türkiye' de Tarım İlaçları Endüstrisi ve Geleceği, V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri 2. Cilt, 17-21 Ocak, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Sayfa, 933-958.
- Delbeke, F., Vercruyssen, P., Tirry, L., De Clercq, P. and Degheele, D. 1997. Toxicity of Diflubenzuron, Pyriproxyfen, Imidacloprid and Diafenthiuron to the Predatory Bug *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga*, 42 (3), 349-358.

- Dere, E., Bakır, S. ve Atalay, A. 1999. Malathion'un Karaciğer, Böbrek ve İnce Bağırsak Alkalen Fosfataz Aktivitesi Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Zoology*, 23, 709–713.
- Demirdöğen, B.C. 2010. Organofosfatlı-Pestisit-Zehirlenmeleri ve Serum Paraoksonaz 1 (Pon1) Enziminin Organofosfat Metabolizmasındaki Rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (2), 97-112, Ankara.
- Dwivedi, P. D., Das, M. and Khanna, S. K. 1998. Role of Cytochrome P450 on Quinalfos Toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, 36 (5), 437–444.
- Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andreas, V. and Featherstone, R.M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.
- El-Sebae, A.H., Salem, M.H., El-Assar, M.R.S. and Enan, E.E. 1988. In Vitro Effect of Profenofos, Fenvalerate and Dimilin on Protein and RNA Biosynthesis by Rabbit Liver and Muscle Tissues. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes.*, Volume 23 (5), 439–451.
- Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marques, E., Molina, R., Roiz, D. and Ruiz, S. 2005. Worldwide Invasion of Vector Mosquitoes: Present European Distribution and Challenges for Spain. *Biological Invasions*, 7, 87–97.
- Gomes, J., Dawodu, A. H., Lloyd, O., Revitt, D.M. and Anilal, S.V. 1999. Hepatic Injury and Disturbed Aminoacid Metabolism in Mice Following Prolonged Exposure to Organophosphorus Pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.*, 18, 33-37.
- Gökalp, O., Gulle, K., Sulak, O., Çicek, E. ve Altuntas, I. 2003. The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C. *Toxicol Ind Health.*, 19(2-6), 63-67.
- Grosscurt, A.C. 1978. Diflubenzuron: Some Aspects of its Ovicidal and Larvicidal Mode of Action and An Evaluation of its Practical Possibilities. *Pesticide Science*, 9 (5), 373–386.
- Gündüz, Ö., Üçüncü ve S. 2013. Diflubenzuron ve Pyriproxyphen'e Maruz Kalan *Cyrtocara Moorii*' nin (Cichlidae, Teleostei) Bağırsak Histopatolojisi. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(2), 113-122.
- Güven, A. 2000. Asetilkolinesteraz'ın Önemi ve İnhibitörleri. *Kafkas Üniversitesi Vet. Fak. Derg.*, 6 (1–2), 145–151.
- Hagar, H.H. and Fahmy, A.H. 2002. Abiochemical, Histochemical, and Ultrastructural Evaluation of The Effect of Dimethoate Intoxication on Rat Pancreas. *Toxicol Lett*, 133, 161–170.

- Handy, R. D., Abd-El Samei, H.A, Bayomy, M. F.F., Mahran, A.M., Abdeen, A.M. and Elalamy, E.A. 2002. Chronic Diazinon Exposure: Pathologies of Spleen, Thymus, Blood Cells, and Lymph Nodes are Modulated by Dietary Protein or Lipid in the Mouse. *Toxicology*, 172 (1), 13–34.
- Hayat, M. A. 1981. Principle and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications, 2<sup>nd</sup> Ed., Vol.1 Edward Arnold Publish, 313p., USA.
- Jeong, S.H., Kim, B.Y., Kang, H.G., Ku, H.O. and Cho, J.H. 2006. Effects of Chlopyrifos-Methyl on Steroid and Thyroid Hormones in Rat F0- and F1-Generations. *Toxicology*, 220 (2–3), 189–202.
- Junquera, L C., Carneiro, J. and Kelley, R.O. 1998. Basic Histology, 9. Ed., Mcgraw-Hill Publishing Co., 495p., Stamford.
- Karaöz, E., Etyemez, T., Akdoğan ,M., Gökçimen ,A., Öncü ,M. ve Akalın,F.E. 2001. Sıçan Karaciğer ve Böbrek Dokularında Endosulfan Toksikitesinde Oksidatif Hasarın Rolü; Histolojik ve Biyokimyasal Bir Çalışma”, *Türkiye Klinikleri Journal Of Medical Sciences*, 21, 1–10.
- Katz, K.D and Brooks, D.E. 2009. Toxicity, Organophosphate. [Http://Emedicine.Medscape.Com/Article/167726-Overview](http://Emedicine.Medscape.Com/Article/167726-Overview).
- Kayhan, F.E.B., Koç, N.D., Contuk, G., Muşlu, M. N. ve Sesal, N.C. 2009. Sıçan Böbrek Dokusunda Endosulfan ve Malathion’ un Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler. *Journal of Arts and Sciences*, 12, 43–52.
- Kierszenbaum, A. L. 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık, 609, Ankara.
- Kim, Y.B, Hur, G.H., Shin, S., Sok, D.E., Kang, J.K. and Lee, Y.S. 1999. Organophosphate-Induced Brain Injuries: Delayed Apoptosis Mediated by Nitric Oxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 7, 147.
- Koçak, E. ve Kılınçer, N. 1997. Juvenil Hormon Analogu Methoprene’in Pamuk Yaprakkurdu [*Spodoptera Littoralis Boisd.* (Lep.:Noctuidae)]’na Etkileri:I. Pupa ve Yumurtalara Etkiler. *Bitki Koruma Bülteni*, 37 (3-4), 163-172.
- Koyama, Y., Kimura, J., Yoshioka, K., Watanabe, T., Seki, T., Hosokawa, S., Yamada, S. and Hagiwara,S. 1989. A Six-Month Chronic Dietary Toxicity Study of Pyriproxyfen in Rats. *J. Toxicol. Sci.*, 14, 43–64.
- Kutty, K. M. 1980. Biological Function of Cholinesterase. *Clin Biochem.*, 13,239-243.
- Lefkowitz, L. J., Kupina, J. M., Hirth, N. L., Henry, R. M., Noland, G. Y., Barbee, J. Y., Zhou, J. Y. and Weese, C. B. 2007. Intraindividual Stability of Human Erythrocyte Cholinesterase Activity. *Clin. Gen.*, 53, 1358–1363.

- Levot, G. and Sales, N. 2008. Resistance to Benzoylphenyl Urea Insecticides in Australian Populations of the Sheep Body Louse. *Medical and Veterinary Entomology*, 22,331–334.
- Maduenho, L. P and Martinez, C. B. R. 2008. Acute Effects of Diflubenzuron on the Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, Volume 148 (3), 265–272.
- Maitra, S. K. and Sarkar, R. 1996. Influence of Methyl Parathion on Gametogenic and Acetylcholinesterase Activity in the Testis of Whitetroated Munia. *Archives of Enviro Contam Toxicol*, 30, 384–389.
- Mars, T. C. 2012. Toxicology Of Insecticides To Mammals. Mini-Review *Pest Manag Sci.*, 68(10),1332-1336.
- Mason, H.J., Sams, C., Stevenson, A.J. and Rawbone, R. 2000. Rates of Spontaneous Reactivation and Aging of Acetylcholinesterase in Human Erythrocytes After Inhibition by Organophosphorus Pesticides. *Hum. Exp. Toxicol.*, 19, 511–516.
- McDowell, L. R. 2000. *Vitamins in Animal and Human Nutrition*. Iowa State University Press. Chapter 14. Iowa.
- Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P. and Quinn, B. 2002. Widely Spread Butyrylcholinesterase can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain. *Neurobiology of Disease*, 9, 88–93.
- Miguel A., Ramos, M.A, Sousa, N.R., Franco, R.A., Costa, V., Oliveria, S.R. and Castro, P.M.L. 2013. Effect of diflubenzuron on the development of *Pinus pinaster* seedlings inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (1),582-590.
- Mittal, P.K. and Kohli, V.K. 1988. The Effect of Diflubenzuron on the Egg Laying and Vitellogenesis in Female *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Res Bull Panjab Univ.*, 39, 93– 100.
- Moneim, M.R., Afify, A. and El-Beltagi, H.S. 2011. Effect of the Insecticide Cyanophos on Liver Function in Adult Male Rats. *Fresenius Environmental Bulletin.*, Vol. 20 (4A), 1084–1088.
- Mulder, R. and Gijswijt, M. J. 1973. The Laboratory Evaluation of Two Promising New Insecticides Which Interfere Cuticle Deposition. *Pestic. Sci.*, 4, 737-745.
- Mulla, M.S., Majori, G. and Darwazeh, H. A. 1975. Effects of the Insect Growth Regulator Dimilin or TH 6040 on Mosquitoes and Some Nontarget Organisms. *Mosq News*,35, 211–216.
- Nakagawa Y. and Moore G. 1999. Role of Mitochondrial Membrane Permeability Transition in P-Hydroxybenzoate Ester-Induced Cytotoxicity in Rat Hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 58 (5), 811-816.

- Neishabouri, E.Z., Hassan, Z.M., Azizi, E. and Ostad, S. N. 2004. Evaluation of Immunotoxicity Induced by Diazinon in C57b1/6 Mice. *Toxicology*, 196, 173-179.
- Noyan, A. 2008. Yaşamda Ve Hekimlikte Fizyoloji. 17. Baskı Meteksan Anonim Şti., Ankara.
- Olsvik, P.A., Samuelsen, O.B., Erdal, A., Holmelid, B. and Lunestad, B.T. 2013. Toxicological Assessment of the Anti-Salmon Lice Drug Diflubenzuron on Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105,27-43.
- O'Malley, M. 1997. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet*. 349, 1161–1166.
- Özata, A. 1983. Endosulfan Enjeksiyonu Yapılmış Farelerin(*Mus musculus*) Karaciğer, Böbrek ve İnce Barsaklarındaki İnce Yapı Değişiklikleri Üzerine Çalışmalar. *Doğa Dergisi Temel Bilimler Seri A*, 7(3), 524–31.
- Robert, L. L. and Olson, J. K. 1989. Effect of Sublethal Dosages of Insecticides on *Culex quinque fasciatus*. *J.M. Mosq. Control Assoc.*, Vol 5, 239–246.
- Roma, G.C., De Oliveira, P.R., Bechara, G.H. and Camargo Mathias M.I. 2012. Cytotoxic Effects of Permethrin on Mouse Liver and Spleen Cells. *Microscopy Research and Technique*, 75, 229–238, Roma.
- Saleem, M. A., Shakoori, A. R., Falkous, G., Wilkins, R. M. and Mantle, D. 1995. In Vitro of Proteolytic Enzymes of Human Liver, Kidney, Brain and Muscle Tissues Due to Insecticides. *Pakistan Journal of Zoology*., Vol. 27(2), 95-103.
- Salokhe, S. G., Deshpande, S.G. and Mukherjee, S.N. 2012. Evaluation of the Insect Growth Regulator Lufenuron (Match[R]) for Control of *Aedes aegypti* by Simulated Field Trials. *Parasitology Research*, 111 (3), 1325.
- Singh, S. K. and Pandey, R. S. 1999. Gonadal Toxicity of Short Term Chronic Endosulfan Exposure to Male Rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, Vol. 28,694-696.
- Smulders C. J. G. M., Bueters T. J. H., Vailati S., van Kleef R. G. D. M. and Vijverberg H. P.M. 2004. Block of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Organophosphate Insecticides. *Toxicological Sciences*, 82, 545–554.
- Solberg, Y. and Belkin, M. 1997. The Role of Excitotoxicity in Organophosphorus Nerve Agents Central Poisoning. *Trends Pharmacol. Sci.*, 18, 183.
- Somkuti, S. G., Lapadula, D. M., Chapin, R. E., Lamb, J. C. and Abau-Donia, M.B. 1987. Testicle Toxicity Following Oral Administration of TOCP in Roosters. *Toxicol Letters*, 37, 279-290

- Taylor, P. 1985. Anticholinesterase Agents. in: Gilman AG and Goodman LS (Eds). The Pharmacological Basic of Therapeutics. Nem York: Macmillan Publishing Co. Inc., Pp.110–28.
- Temel, S. ve Gökçimen, A., 2002. Karaciğer Yıldızsı Hücreleri (Ito Hücreleri). T Klin Tıp Bilimleri, 22, 342-348.
- Toros, S. ve Maden, S. 1985. Tarımsal Savaş Yöntem Ve İlaçları. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Ulusoy, Y., Toprak, B., Uzunhisarcıklı, M. ve Öğütçü, A. 2004. Diazinonun Sıçan Hepatositleri Üzerine Etkisinin Elektron Mikroskobu İle İncelenmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 15 (1–2), 29–36, Ankara.
- Ural, M., Özgüner, M., Büyükvanlı, B., Kuplay, H. ve Köylü, H. 2006. Akut Diazinon Toksisitesinin Testis Dokusunda Oluşturduğu Histolojik Değişiklikler Ve Bu Değişikliklere C Vitamini Ve E Vitaminin Etkisi. S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi, 13 (2), 22–25.
- Van Daalen, J. J., Meltzer, J., Mulder, R. and Wellinga, K. 1972. A New Insecticide With A Novel Mode Of Action. Naturwissenschaften, 59, 312-313.
- Wang, H. Y., Yang, Y., Su, J. Y., Shen, J. L., Gao, C. F. and Zhu, Y. C. 2008. Assessment of the Impact of Insecticides on *Anagrus nilaparvatae* (Pang Et Wang) (Hymenoptera: Mymanidae), An Egg Parasitoid of the Rice Planthopper, *Nilaparvata Lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Crop Protection, Volume 27 (3-5), 514-522.
- Wang, C., Lu, G. and Cui, J. 2010. Responses of AChE and GST Activities to Insecticide Coexposure in *Carassius auratus*. Environmental Toxicology, 27(1), 50-57.
- Ware, G.W. 2000. The Pesticide book. Thompson Publications, Fresno, California.
- Wilson, B. 2010. Cholinesterases. In: Krieger R, Editor. Hayes Handbook Of Pesticide Toxicology, 3<sup>rd</sup> Edition. Ch. 68, 1457–1478, London.
- Young, M. F., Trombetta, L. D. and Carson, S. 1986. Effect of Diflubenzuron on the Mouse Liver. Journal of Applied Toxicology, Volume 6 (5), 342–348.
- Zaidi, N. and Soltani, N. 2010. Chronic Toxicity of Flucycloxuron in the Mosquitofish, *Gambusia affinis*: Acetylcholinesterase and Catalase Activities and Pattern of Recovery. Annals of Biological Research, 1 (4), 210-217.
- Zimmer, R. K., Lencina, L. L., Zimmer, A. R. and Thiesen, F. V. 2012. Influence of Physical Exercise and Gender on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity in Human Blood Samples. International Journal of Environmental Health Research, Vol. 22 (3), 279–286.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Eda YAZICI

**Doğum Yeri** : KARABÜK

**Doğum Tarihi** : 10.01.1988

**Medeni Hali** : Evli

**Yabancı Dili** : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise** : Karabük- Demir Çelik Lisesi-2005

**Lisans** : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü- 2010

**Yüksek Lisans** : Ankara Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı-  
(Temmuz 2015)

### **Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl:**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi- Tıbbi Mikrobiyoloji ABD 2013-2015

### **Ulusal Kongre Sunum**

III. Ulusal Biyosidal Kongresi (1-4 Kasım 2013) Şanlıurfa-

Diflubenzuronun Akvatik Ortamdaki Rezidüel Etkinliği