

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA SİPERMETRİN TOKSİSİTESİNE BAĞLI
KARACİĞER HASARINDA CB2 AGONİSTİ JWH-
133'ün SAĞALTICI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hidayet TUTUN

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Emine BAYDAN

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 114S964 numaralı projesi ile desteklenmiştir

2016-ANKARA

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda Sipermetrin Toksisitesine Bağlı Karaciğer Hasarında CB2 Agonisti JWH-133’ün Sağaltıcı Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hidayet TUTUN

Tarih: 23.05.2016

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında

Hidayet TUTUN tarafından hazırlanan

“Sıçanlarda Sipermetrin Toksisitesine Bağlı Karaciğer Hasarında CB2 Agonisti

JWH-133’ün Sağaltıcı Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17.05.2016



İmza

Prof.Dr. Emine BAYDAN

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



İmza

Prof.Dr. Arif KURTDEDE

Ankara Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye



İmza

Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Raportör



İmza

Prof.Dr. Murat KANBUR

Erciyes Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Üye



İmza

Doç.Dr. Ebru YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof.Dr. K. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sipermetrin	2
1.2. Kannabinoid Sistem	7
1.2.1. Kannabioid Ligandlar	9
1.2.2. Endokannabinoid Sistemin Biyosentezi ve Regülasyonu	10
1.2.3. Kannabinoid Reseptörlerin Karaciğer Üzerine Etkileri	11
2. GEREÇ ve YÖNTEM	16
2.1. Gereç	16
2.1.1. Kimyasal Maddeler	16
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	17
2.1.3. Hayvan Materyali	17
2.2. Yöntem	17
2.2.1. Etik	17
2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü	18
2.2.3. Morfometrik Parametreler	19
2.2.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri	19
2.2.5. Oksidatif Stres Parametreleri	19
2.2.5.1. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini	20
2.2.5.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	21
2.2.5.3. MDA Tayini	22
2.2.6. Histopatolojik inceleme	23
2.2.7. Immunohistokimya	23
2.2.8. CB2 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçülmesi	24
3. BULGULAR	40
3.1. Morfometrik Parametreler	40
3.2. Klinik Bulgular	40
3.3. Oksidatif Stres	41
3.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri	42
3.5. RT-PCR Analizleri	42

3.6. Immunohistokimyasal Bulgular	45
3.7. Histopatolojik Bulgular	55
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	87



ÖNSÖZ

Piretroit grubu bir bileşik olan sipermetrin başta kene olmak üzere pek çok farklı böcek türüne etkili, doğada kolay parçalanabilen bir pestisittir. Sipermetrine akut ya da kronik maruziyetin memeli karaciğerinde son yıllarda yapılan araştırmalar toksik etkilerinin (özellikle kronik toksikasyona bağlı) olduğunu ortaya koymuştur. Sipermetrinin hepatotoksik etkilerine yönelik endokannabinoid sistemin davranışı konusunda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Farklı kimyasallarla yapılan araştırma sonuçlarından hareketle, sipermetrinin karaciğerde oluşturduğu toksik etkilere karşı endokannabinoid sistemin aktif hale geçebileceği düşünülmektedir.

Proje kapsamında sipermetrinle subakut toksisite oluşturulan ratlarda CB2 reseptör agonisti JWH-133'ün karaciğere yönelik etkisi incelendi. Bu çalışma ile sıçanlarda sipermetrine maruziyetin karaciğer üzerine olan zararlı etkisi; bu zararlı etkiye bağlı olarak karaciğerde CB2 reseptörlerinin hangi hücrelerde ve hangi düzeyde eksprese edildiği, sipmetrin toksisitesine bağlı karaciğer hasarına karşı CB2 agonisti JWH-133'ün koruyucu etkisi, keza sipermetrine maruz kalmayan sıçanlarda CB2 agonisti JWH-133'ün etkisi RT-PCR, immunohistokimya, histopatoloji, oksidatif stres parametreleri ve karaciğer fonksiyon testleri ile incelenmiştir.

Tez çalışması süresince çalışma konusunu belirlemede, çalışmaların yürütülmesinde ve doktora eğitimimin süresince, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof.Dr. Emine BAYDAN'a; tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Arif KURTDEDE, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ'a; Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda bulunan hocalarıma, idari ve yardımcı elemanlarına; Viroloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Aykut ÖZKUL, Araş.Gör. Nuvit ÇOŞKUN, Sabri HACIOĞLU, Araş.Gör. İlke KARAYEL, Araş.Gör. Fırat DOĞAN'a; Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Tevhide SEL, Araş.Gör.Dr. Öğünç MERAL, Araş.Gör. Efe

KURTDEDE'ye; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Alev Gürol BAYRAKTAR, Araş.Gör. Mehmet ÖZBEK, Araş.Gör. Nuh YILDIRIM, Araş.Gör. Özge ÖZGENÇ'e, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Osman KUTSAL, Araş.Gör. Ozan AHLAT'a; Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Araş.Gör. Ufuk KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.



SİMGELER VE KISALTMALAR

HSC	Hepatic Stellate Cell, Ito hücresi
β	Beta
CB2	Kannabinoid Reseptör 2
IP	Intraperitoneal, Periton içi
PO	Peros, Ağızdan
CB1	Kannabinoid Reseptör 1
CB2	Kannabinoid Reseptör 2
μ g	mikrogram
ml	miligram
pg	pikogram
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ÖD ₅₀	Öldürücü Doz 50
TRPV-1	Kapsaisin reseptör ve vallinoid reseptör 1
AEA	Anandamide
NADA	N-araşidonil dopamin
2-AG	2-araşidonil gliserol
HepG2	İnsan Hepatoma Hücre Hattı
IL	Interlökin
D9-THC	Δ^9 -tetrahidrokannabinol
FAAH	Yağ Asit Amid Hidrolaz
I/R	İskemi/Reperfüzyon
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
DMSO	Dimetilsülfoksit
SOD	Süperoksit Dismutaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
TBARS	Thiobarbiturik Asit Reaktif Substant
MDA	Malondialdehit
NİS	Nükleaz İçermeyen Su
FNF	Fulminant Hepatic Failure, Akut Karaciğer Hasarı
EPA	Çevre Koruma Ajansı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sipermetrin (8 izomeri).	3
Şekil 2.1. Elektroforezde 18S ve 28S Bandında RNA'nın Görüntülenmesi.	33
Şekil 2.2. cDNA Sentezinde Pozitif Kontrol Çalışmasında PCR Ürünün 496 bp'de Görüntülenmesi.	36
Şekil 3.1. Standart Eğrilerinin Oluşturulması Amacıyla Hazırlanan Sulandırılmalara Ait Amplifikasyonlar.	43
Şekil 3.2. CB2 RT-PCR İçin Standart Eğri Grafiği.	43
Şekil 3.3. Uygulama Gruplarında Bulunan Sıçanların Karaciğer Dokusundaki CB2 mRNA Sonuçları.	44
Şekil 3.4. Karaciğer Dokusunda CB2 mRNA Düzeylerinin Standart Eğri Üzerindeki Yerleşimi.	44
Şekil 3.5. Dalakta CB2 Reseptör Ekspresyonu İçin Pozitif ve Negatif Kontrol Boyaması.	46
Şekil 3.6. Negatif Kontrol Grubundaki Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı.	47
Şekil 3.7. Grup 1'de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı.	47
Şekil 3.8. Grup 1'de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun Trias Hepatis Çevresindeki Dağılımı.	48
Şekil 3.9. Grup 2'de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı.	49
Şekil 3.10. Grup 2'de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun Trias Hepatis Çevresindeki Dağılımı.	49
Şekil 3.11. Grup 3'te CB2 Reseptör Ekspresyonun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı.	50
Şekil 3.12. Grup 3'te CB2 Reseptör Ekspresyonunun Trias Hepatis Bölgesindeki Dağılımı.	51
Şekil 3.13. Grup 4'ten CB2 Reseptör Ekspresyonunun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı.	52
Şekil 3.14. Grup 4'te CB2 Reseptör Ekspresyonunun Trias Hepatis	52

Çevresindeki Dağılımı.

Şekil 3.15.	Sipermetrin Uygulanan Sıçanlarda Hücrel	53
İmmunreaksiyonların Gösterilmesi.		
Şekil 3.16.	Sipermetrin Uygulanan Sıçanlarda Hücrel	54
İmmunreaksiyonların Gösterilmesi.		
Şekil 3.17.	Grup 2'den Alınan Sıçan Karaciğeri.	55
Şekil 3.18.	Sadece Sipermetrin Uygulanan Sıçandan Alınan Karaciğer	56
Görünümü.		
Şekil 3.19.	Sadece Sipermetrin Uygulanan Sıçanın Karaciğer Görünümü.	57
Şekil 3.20.	Sipermetrin + JWH-133 Uygulanan Sıçanın Karaciğer	58
Görünümü.		
Şekil 3.21.	Sipermetrin + JWH-133 Uygulanan Sıçanın Karaciğer	58
Görünümü.		
Şekil 3.22.	Sadece JWH-133 Verilen Sıçanın Karaciğer Görünümü.	59
Grafik 3.1.	CB2 Karaciğerde Ekspresyonu.	45

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Sipermetrinin Tanınması.	4
Çizelge 1.2. Bazı Hayvanların İçin Sipermetrinin Akut Toksisite $ÖD_{50}$ Değerleri.	5
Çizelge 2.1. Sipermetrin ve JWH-133'ün Gruplara Uygulanması.	18
Çizelge 2.2. QRT-PCR İçin FORWARD ve Reverse Primerler, Probe ve Kontrol Dizilimi.	25
Çizelge 2.3. Sıçan (<i>Rattus norvegicus</i>) Kannabinoid Reseptör 2 Geni.	25
Çizelge 2.4. Gene Rotor PCR Cihazına 1 Godeye Konulan Maddelerin Miktarları	27
Çizelge 2.5. Dokuz Farklı Standart Dozu.	28
Çizelge 2.6. GeneJET RNA Purifikasyon Kit İçeriği.	29
Çizelge 2.7. TE Buffer Hazırlanmasında Kullanılan Bileşenlerin Miktarı.	30
Çizelge 2.8. Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit İçeriği.	33
Çizelge 2.9. cDNA Sentezi İçin Gereken Bileşenler.	34
Çizelge 2.10. cDNA Sentezi İçin Gereken Bileşenler.	35
Çizelge 2.11. Pozitif Kontrol İçin Gereken Bileşenler.	35
Çizelge 2.12. cDNA Sentezi Protokolunda Gereken Bileşenler.	37
Çizelge 2.13. cDNA Sentez Protokolünde Gereken Bileşinler.	37
Çizelge 2.14. RT-PCR Protokolü İçin Gereken Bileşenlerin Miktarları.	38
Çizelge 3.1. Gruplara Göre Sıçanların Vücut Ağırlık Artışı ve Relatif Karaciğer Ağırlığı.	40
Çizelge 3.2. Sipermetrin ve JWH-133 Ligandı Verilen Sıçanların Karaciğer Dokusundaki Oksidatif Stres Parametreleri.	41
Çizelge 3.3. Serumda Karaciğer Enzim Aktiviteleri ve Glukoz Miktarı.	42
Çizelge 3.4. Gruplarda Bulunan CB2 mRNA Miktarı.	44
Çizelge 3.5. Karaciğerde Eksprese Edilen CB2 Reseptörlerinin Hücresel Dağılımı ve Gruplar Arasındaki Miktar Farkı.	54

1. GİRİŞ

Canlı ve cansız yüzeylerde böcekleri öldürmek için kullanılan kimyasal maddelere pestisit adı verilir. Pestisitler memelilerde maruziyet süresine göre akut, subakut veya kronik zehirlenmelere yol açar. İnsan ve hayvanlarda pestisitlerle zehirlenmelere ilişkin çok sayıda kayıt vardır. WHO dünyada yılda yaklaşık 3 milyon akut pestisit zehirlenmesi olduğunu bildirmektedir (WHO, 1990). Jeyaratnam (1990) geliştirmekte olan ülkelerde tarım işçilerinde her yıl 25 milyon rastlantısal pestisit zehirlenmesi meydana geldiğini bildirilmektedir. Subkronik ve kronik zehirlenmelerde çoğu kez, uygulamada hedef konumda olmayan insan ve hayvanlar istem dışı olarak bu maddelere maruz kalmaktadır. Bu maddelere özellikle uzun süreli maruziyet durumlarında doku ve organlarda çeşitli sağlık problemlerine yol açarlar (El-Damaty ve ark., 2012; Maund ve ark., 2012). Günümüzde kanser oranlarındaki artışın ana sebepleri arasında pestisitler ilk sırada gösterilir (Woolansky ve ark., 2006). Ancak, halk sağlığında, birçok hastalığı taşımaları sebebiyle böceklerle karşı mücadele de zorunlu gözükmemektedir. Belirtilen nedenle kapalı ve açık alanlarda pestisitler yaygın şekilde kullanılır (Çalışkan ve ark., 2003). Pestisitlerden kaynaklı istenmeyen etkileri en aza indirebilmek için konu ile ilgili uluslararası kuruluşlar en güvenli kabul edilen pestisitlerin insan ve hayvan sağlığında kullanımına izin vermektedir. Sipermetrinin yer aldığı piretroid grubu pestisitler diğer pestisitlere göre akut toksik etki bakımından güvenli grubu oluşturur. Diğerlerine nazaran güvenli kabul edilmesi nedeniyle Dünya'nın pek çok yerinde olduğu gibi Türkiye'de de piretroid grubu insektisitler, özellikle de bu gruptan olan sipermetrin farklı alanlarda pestle mücadele için yaygın olarak kullanılır. Piretroidler insan sağlığı yönünden en geniş güvenlik indeksine sahip maddeler olarak kabul edilmekle birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalar bu maddelerin kronik toksik etkilerinde olabileceğini göstermektedir (Kanbur ve ark., 2014).

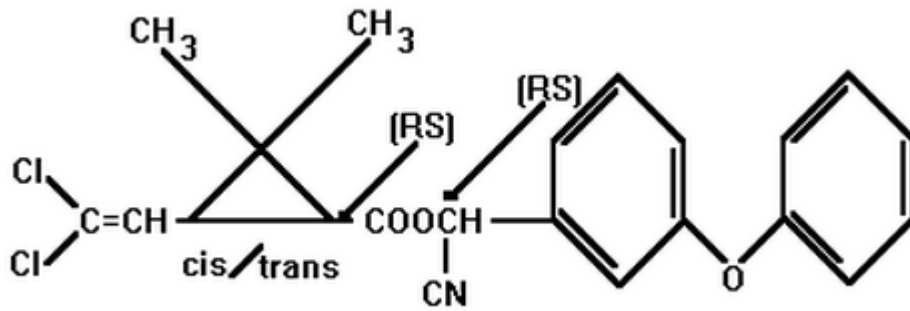
Biyolojik sistemin önemli unsuru olan karaciğer, ilaç ve ksenobiyotikler için ana hedef organdır ve bu organ kimyasal maddeleri metabolize ederek zararsız hale getirmeye çalışır. Karaciğer biyotransformasyon görevini farklı mekanizmalar üzerinden yapar. Bu mekanizmalar oldukça karmaşıktır ve henüz karaciğer ile diğer doku ve organlarda kimyasal maddelerin etki mekanizmalarının anlaşılmasında çözümlenmemiş pek çok yolağın olduğu düşünülmektedir. İlaç ve kimyasal maddelerin etki mekanizmalarının anlaşılmasında son yıllarda üzerinde en fazla durulan biyolojik sistemlerden biri de endokannabinoid sistemidir. Bu sistem vücudun savunma, tamir gibi birçok fizyolojik sürecinde etkin rol oynar. Sistemin karaciğerdeki etkisine yönelik bilgiler oldukça azdır. Sağlıklı karaciğerde endokannabinoid sistemin etkileri gözlenmezken, hasarı tetikleyen birkaç durumda endokannabinoid sistem aktif hale gelir (Teixeira-Clerc ve ark., 2010). Sistemin aktivasyonu etkileşen reseptör tipiyle ilgili olarak farklı fizyolojik cevapların ortaya çıkmasına neden olur. Genel olarak CB2 reseptörlerin aktivasyonu ile çevresel dokularda antifibrojenik, antiinflamatuvar ve oksidatif stres önleyici etkiyle karaciğer üzerinde iyileştirici etki gözlenir (Julien ve ark., 2005; Mallat ve ark., 2007). Ancak, CB1 reseptörlerin aktivasyonu vücuttaki hasarın daha da kötüye gitmesine neden olabilir (Teixeira-Clerc ve ark., 2006).

1.1. Sipermetrin

Pestisit zararlı organizmaları öldürmek, kaçırmak ve kontrol etmek için kullanılan preparatlardır. Besinlere ve tarımsal alanlara zarar verebilen böcekler, yabani otlar, bitki patojenleri, yumuşakçalar ve mikroorganizmaların kontrolünde kullanılırlar (McEven ve Stephenson, 1979). Pestisit gibi toksik kimyasal maddeler toprak, hava, su, hayvan ve insan dokularında bulunmakta, canlıda zararlı etkilere, hatta ölümlere neden olmaktadır. Pestisit grubundan olan piretroidler veteriner ve insan hekimliğinde, orman, tarım, ve evlerde böcek kontrolünde geniş kullanım alanına sahiptirler (Grewal ve ark., 2009). Piretroidler birçok böcek türüne karşı etkili olması, memelilere karşı düşük zehirliliği ve doğada kolay parçalanabilmesinden dolayı, organik klorlu, organik fosforlu ve karbamatların yerine tercih edilmekte ve Türkiye de dahil pek çok ülkede kene, bit, pire, sinek vb.

zararlılarla mücadelede sıklıkla kullanılmaktadırlar. Türkiye’de gerek insan (halk sağlığı) ve gerekse hayvan sağlığında resmi kullanıma uygun olarak ruhsatlandırılmış çok sayıda preparatı bulunur (Erdoğan, 2010; Shakoori ve ark., 1988). Ancak, piretroidlerin özellikle kronik zehirliliklerine yönelik raporlar gün geçtikçe artmakta ve memelilere karşı güvenli olduğu iddiası geçerliliğini yitirmektedir (Shakoori ve ark., 1988). Tarımsal ve diğer evsel uygulamalarda geniş kullanım alanı bulan sipermetrine üreticiler, hijyen ve pestisit çalışanları ile küçük çiftlik sahipleri yüksek düzeyde; kontamine olan gıda ve suyu kullanan kişiler ise düşük düzeylerde sipermetrine maruz kalabilmektedirler (Gorell ve ark., 1998).

Sipermetrin piretrinlerden hareketle hazırlanan sentetik maddelerdir; bugüne kadar çok sayıda piretroid madde hazırlanmıştır. Türkiye’de zirai mücadele, veteriner hekimlik ve halk sağlığı ilacı olarak geniş şekilde kullanılmaktadır. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü’nün (2016) verilerine göre ülkemizde 58 adet piretroid içeren müstahzar bulunmakta; bunlardan 13 tanesi sipermetrin etken maddesi içermektedir. Piretroidler genellikle ışık ve ısıya duyarlılıkları veya dayanıklılıkları; etki hızları ve etki süreleri; bulunma sıralarına göre sınıflandırılır. Sipermetrin (Şekil 1.1), bulunma sıralarına göre 4. nesil bileşikler, dayanıklılıklarına göre ise ışığa dayanıklı bileşikler grubunda yer alır (Baynes, 2009).



Şekil 1.1. Sipermetrin (8 izomeri) (Inchem, 2016).

Sipermetrin (2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyclopropane carboxylic acid’in alpha-cyano-3-phenoxybenzyl ester) tip II piretroid grubundan en çok kullanılan pestisitlerdendir. Sipermetrin siyanobenzil esteridir; permetrinin α -siyano

analoğudur; çok sayıda izomeri vardır (Çizelge 1.1). Teknik madde kıvamlı-yarı katı, sarımsı-kahve renkte, 80,5 °C’de sıvılaşıp, buhar basıncı 190 nPa, suda pratik olarak çözünmeyen aseton ve kloroformda ≥ 450 mg/ml, etilalkolde ≥ 337 mg/ml miktarda çözünen, ışık ve asidik şartlara dayanıklı, ancak alkali şartlara dayanaksız bir maddedir. Ayrıca, sikloheksan (>600 mg/ml) ve ksilende çözülebilmektedir. 220 °C’de oldukça stabil kalabilmektedir. Optimum dayanıklılığı pH 4’te olmasına rağmen alkali ortamda dekompoze olmaktadır (Camilleri, 1984; FAO, 2016). Sipermetrinin alfa-, beta-, zeta-, tetra- gibi birçok izomeri vardır; bunların fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri arasında önemli farklar mevcuttur (FAO, 2016).

Çizelge 1.1. Sipermetrinin tanınması (WHO, 1989).

TUPAC	(RS)- γ -cyano-3-phenoxybenzyl(1RS)-cis, trans-3-(2,2 dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
CAS no. 1	(RS)-cyano (3-phenoxyphenyl)methyl (1RS)-cis, trans-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
CAS reg. No.	52315-07-8
Mol. Formülü	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$
Mol. Ağırlığı	416.32

Gastrointestinal sistemden çok iyi emilen sipermetrin inhalasyon yoluyla da absorbe olabilmektedir. Sipermetrin karaciğer mikrozomal esteraz ve oksidaz ile metabolize olur. Cis izomeri daha dayanıklıdır. Genellikle esterleşmeden önce hidroksilasyona maruz kalır. Köpekler hariç birçok hayvanda % 80’den fazlası idrar ile atılır. Dışkı ile eliminasyon oranı düşüktür. Esterleşme ile siklopropanekarboksilik asit ve 3-fenoksibenzol alkol kısımlarına ayrılır. 3-fenoksibenzol alkol 3-fenoksibenzoik aside (3-PBA) oksitlenir (Inchem, 2016).

Sipermetrin çevrede dayanıklılığı bakımından orta derecede kalıcı bir maddedir. Topraktaki parçalanma yarı-ömrü 4-56 gün arasında, güneş ışığında parçalanma yarı-ömrü ise 6-16 gün arasında değişir (Hamilton, 2015). Sipermetrin uygulanmasından sonra havada, duvarda, zeminde ve ev eşyalarında 86 gün kadar kalabilmektedir (Wright ve ark., 1993).

Deri ile temas ettiğinde, yutulduğunda veya solunulduğunda zararlıdır; gözler için irkilticidir ve deriye temas ettiğinde alerjiye-duyarlılığa sebep olabilir. Sipermetrin orta derecede zehirli (Sınıf II) bir madde olarak sınıflandırılır (US EPA, 1989). Zehirliliği izomer çeşidi ve çözücüsüne göre önemli ölçüde değişir (Hamilton, 2015).

Tek doz sipermetrin toksisitesi kullanılan taşıt maddenin tipine göre değişiklik gösterir. Genelde sulu süspansiyonları en az toksik, non-polar çözeltileri ise en toksiktir (mısır yağında fare için $ÖD_{50}$ 82 mg/kg canlı ağırlık iken sulu süspansiyonlarında bu değer 750 mg/kg canlı ağırlıktır). Cis-izomer trans izomere göre neredeyse 10 katı daha toksiktir. Bir karışımın akut toksisitesi izomer oranına göre belirlenir. Bazı hayvanlara göre $ÖD_{50}$ değerleri Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bazı Hayvanlar İçin Sipermetrinin Akut Toksisite Oral $ÖD_{50}$ Değerleri (Coombs ve ark., 1976).

Hayvanlar	Oral $ÖD_{50}$
Rat (Erkek, Dişi)	303 mg/kg c.a. (cis:trans, 50:50, dimetilsülfoksit).
Rat (Erkek)	251 mg/kg c.a. mısır yağı).
Fare (Erkek, Dişi)	138 mg/kg c.a. (cis:trans, 50:50, dimetilsülfoksit).
Tavşan (Dişi)	+2400 mg/kg c.a. (cis:trans, 40:60, dilue edilmemiş) .
Kobay (Erkek, Dişi)	500-1000 mg/kg c.a. (cis:trans, 50:50, Mısır yağı) .

Ratlar üzerinde yapılmış çalışmalarda (25-200 mg/kg/gün, 5 gün süresince, ağızdan) ve hamsterlerde (5-30 mg/kg/gün, 5 gün süresince, ağızdan) tekrarlanan dozlarda da toksisite bulguları gözlenmiştir. (Inchem, 2016).

İyi bir insektisit olan sipermetrin memelilere ve kuşlara karşı diğer insektisitlere nazaran düşük toksisiteye sahip iken; suda yaşayan canlılara karşı toksik etkisi oldukça güçlüdür (Dobsikova ve ark., 2006). Laboratuvar şartlarında arılar için son derece zehirlidir. Arılarda sipermetrinin $ÖD_{50}$ ’si 0,025 µg/arı ve temas şeklinde (4 saat) 425 mg/1000 m² dolayındadır (Jones, 2015).

Fare ve sıçanlarda sipermetrin toksisitesi üzerine yapılmış çalışmalarda maddenin karaciğer, mide, bağırsak, dalak, pankreas ve böbrek gibi farklı bir çok organda histopatolojik değişiklikler meydana getirdiği gösterilmiştir (El-Damaty ve ark., 2012; Maund ve ark., 2012). Özellikle hamile kadın, bebek ve çocukların bu maddelere maruziyeti noktasında oldukça hassas oldukları anlaşılmıştır (Yanez ve ark., 2004). Zararlı etkileri daha çok olan organik fosforlu bileşiklerin kullanımının azaltılmasından dolayı 1998'den bu yana sipermetrinin kullanımı giderek artmaktadır (Amveg ve ark., 2005). Piretroid kalıntıları ratlarda epilepsi, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları (Pandit ve ark., 2005), somatik büyüme depresyonu, neuritis ve testiküler kanser ve motor aktivitede doza bağımlı azalma meydana getirmektedir (Woolansky ve ark., 2006). Karaciğer vücuttan toksik maddelerin atılması ve metabolizmasında görevli olduğu için insektisitlerin toksisitesini incelemede sıçan karaciğer histopatolojik parametrelerinin değerlendirilmesi kilit öneme sahiptir (Dessouki ve ark., 2013; El-bendary ve ark., 2014).

Sipermetrin lipofilik özelliğinden dolayı vücut yağında, deride, karaciğerde, böbrekte, adrenal bezlerde, ovaryumda ve beyinde birikir (Hall ve ark., 1980). Sipermetrin böceklerde nöronal membranda integral protein ATPaz ve voltaj bağımlı sodyum kanallarını etkileyerek nörotoksik etki oluşturur (Kakko ve ark., 2003). Hedef olmayan canlılarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda sipermetrinin beyinde, karaciğerde (Giray ve ark., 2001; Islam ve ark., 2014; Nair ve ark., 2015) ve eritrositlerde (Kale ve ark., 1999) serbest radikal aracılı doku hasarına, nekrotik etki ve yangısal reaksiyonlara neden olduğunu ve fare kemik iliği ve dalakta kromozomal aberasyon ve mikronükleus formasyonunu tetiklediğini göstermiştir (Amer ve ark., 1993; Kale ve ark., 1999). Ayrıca, sipermetrine maruz kalan çalışanların lenfositlerinde DNA hasarı oluşmuştur (Patel ve ark., 2006; Undeğer ve Basaran, 2002). Sipermetrin EPA tarafından kanserojen olarak tanımlanmıştır. Sipermetrinin karaciğer üzerine olan toksik etkisi birçok mekanizma tarafından oluşturulmaktadır (EPA, 1989).

Sipermetrin paleomonlardan *Palaemonetes argentinus*'da (Collins ve Cappello, 2006) olduğu gibi pek çok canlı türünde birçok organ ve dokuda

histopatolojik değişikliklerin yanı sıra kanda ve dokularda biyokimyasal değişiklikler meydana getirmektedir. Aynalı sazan-*Cyprinus carpio L* (Simon ve ark., 1999), Asya sazanı-*Labeo rohita* (Das ve Mukherjee, 2003) gibi farklı balık türlerinin farklı organlarında, aldoloz, karboksipeptidaz A, α -kemotripsin, ATPaz, laktat dehidrojenaz, lipaz, fosforilaz a, fosforilaz b, ve tripsin gibi enzimlerinde ve glikojen, laktat, piruvat, protein, DNA ve RNA gibi biyokimyasal bileşiklerinde sipermetrin kaynaklı değişiklikler gözlenmiştir. İn vivo ve in vitro çalışmalar, sipermetrinin hepatositlerde karaciğer ATPaz aktivitesini engellediğini ve yangı, nekrozis ve sitoplazmik hipertrofiyi artırdığını göstermiştir (Aldana ve ark., 2001; El-Toukhy ve Girgis, 1993).

Sipermetrin sıçanlarda periferel kan “Doğal Öldürücü-NK” hücre ve antikor kaynaklı sitotoksik etkide artışa neden olmuştur (Santoni ve ark., 1997). Ayrıca, erkek sıçanlarda kemik iliği hücrelerinin kromozomlarının aberasyonunda artma, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunda azalma gözlenmiştir (Institoris ve ark., 1999). Sipermetrin verilmesinden sonra dişi farelerde hemopoetik sistemin baskılanması ve periferel kanda lökositlerin sayısında artış gözlemiştir (Haratym-Maj, 2002).

1.2. Kannabinoid Sistem

Marijuananın ana aktif maddesi Δ^9 -tetrahidrokannabinol bileşiğinin bağlandığı membran reseptörünün keşfi endokannabinoid sistem olarak bilinen yeni bir içsel yolağın tanımlanmasına sebep olmuştur (Felder ve ark., 1992). Bu sistem kannabinoid reseptörler, onların içsel ligandları ve onların sentezi ve inaktivasyonlarında görevli proteinlerden meydana gelmektedir. İçsel kannabinoid ailesinde anandamid (AEA), 2-araşidonil gliserol, virodhamin, noladin eter, ve N-araşidonil-dopamin gibi maddeler bulunur. Bu bileşikler kannabinoid reseptörler aracılığıyla onların aktivitelerini arttırırlar. CB1 (Matsuda ve ark., 1990) ve CB2 (Munro ve ark., 1993) olmak üzere iki kannabinoid reseptör klonlanmış ve tanımlanmıştır. Her iki reseptör G protein ile kenetlidir, adenilat siklaz ve kalsiyum

kanalları yolu ile etkilerini gösterir (Devane ve ark., 1988). Endokannabinoid sistem inflamasyon, kanser ve metabolik, kardiovasküler, gastrointestinal ve karaciğer hastalıklarında umut veren yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmıştır (Di marzo ve ark., 2004; Gabbay ve ark., 2005; Mallat ve Lotersztajn, 2008; Massa ve ark., 2004; Pacher ve ark., 2006).

Kannabinoid sistemi oluşturan reseptörler vücudun çeşitli dokularında bulunmaktadır. CB1 reseptörü kodlayan gen, kromozom 6 (6q14-q15) üzerinde lokalize olur. CB1 mRNA'sı farenin gebeliğinin 15. gününde embriyoda belirlenmiştir. Postnatal ekspresyonu ise en çok beyinde ve omurilikte gözlenmiştir (Fride, 2004). CB1'in ekspresyonu merkezi sinir sisteminde gamma-aminobutirik asit ve glutamat-iyon kanalları ile ilişkilidir. CB1, GABA-erjik ve glutamaterjik nöronların üzerinde presinaptik bölgede lokalize olmuştur ve sinyal geçişlerinin nöromodülasyonunda görev alır. CB1 beyinde motor aktivite, hafıza ve bilinç, duygu, algılama duyusu ve otonomik ve endokrin fonksiyonların kontrolünde etkilidir (Basavarajappa, 2007; Pacher ve ark., 2006). CB1 merkezi sinir sisteminin yanı sıra kalp, akciğer, sindirim sistemi, karaciğer, böbreküstü bezi, idrar kesesi, plesenta, uterus, ovarium, testis, deri ve yağ doku gibi periferel dokularda da eksprese edilmektedir (Boulais ve Misery, 2008; Komorowski ve Stepien, 2008; Kupczyk ve ark., 2009; La Croce ve ark., 2015; Teixeira-Clerc ve ark., 2006; Van Sickle ve ark., 2005). Ayrıca, CB1 çevresel sinir sonlarında ve damar endotelyumunda eksprese, CB2 reseptörler ise başlıca hemopoetik hücreler ve immun sistem hücrelerinde eksprese edilirler (Pacher ve ark., 2006).

CB2 geni kromozom 1 (1p36,11) üzerinde lokalize olur. CB2 reseptör, mRNA, hem prenatal hemde postnatal hayatta saptanmıştır. CB2 immun sistem ile ilişkili olan dokularda eksprese edildiği için bu reseptörler immunokannabinoid sistem reseptör olarak da isimlendirilir (Basavarajappa, 2007; Buckley ve ark., 2006). CB2, B ve T lenfosit, NK hücreleri, monosit ve dalak, tonsil ve timüs gibi immun organlarda saptanmıştır (Klein ve ark., 2003). Ayrıca, CB2 karaciğer gibi bazı dokularda da bulunmaktadır (Teixeira-Clerc ve ark., 2010).

Kannabinoidler tarafından aktive edilen daha birçok reseptörün olduğu gözlenmiştir. GPR-55 ve GPR-119, kannabinoid ligandlar ile etkileşebilen ve CB1/CB2 dışındaki mekanizmaları aktive edebilen iki varsayılan reseptördür. GPR-55 çeşitli kannabinoidler tarafından aktive edildiği rapor edilmiştir. Ancak, GPR-119 aleoylethanolamide için bir reseptördür. Bu reseptörlerin rolü bilinmemektedir. Bazı çalışmalar GPR-55 in kardiovasküler sistem, yangı ve ağrıda önemli olabileceğini bildirmektedir (Baker ve ark., 2006; Staton ve ark., 2008). Ancak, bu reseptörlerin varlığı kesinleşmemiştir. Kannabinoidler için bir diğer hedef TRPV-1'dir (Caterina ve ark., 1997). TRPV-1 birçok yangısal mediyatör ve kapsasin ve endokannabinoid tarafından aktive edilebilir (Ahluwalia ve ark., 2003).

1.2.1. Kannabinoid Ligandlar

Kannabinoidler, kannabinoid reseptörlere bağlanan ligandlar grubu için verilmiş bir isimdir. Ligandlar kannabinoid reseptörler ile bağlandıklarında çeşitli biyolojik cevaplar oluştururlar. Bunlar içsel ve eksojen ligandlardır (Iversen, 2003). Üç çeşit kannabinoid çeşidi vardır: endokannabinoidler, fitokannabinoidler ve sentetik kannabinoidler. Endokannabinoidler doğal olarak insan veya hayvanların vücutlarında sentezlenir. Hayvansal dokulardan elde edilen ilk endokannabinoid N-araşidoniletonalamin (anandamide veya AEA) 1992 yılında bir domuz beyninden izole edilmiştir. Bilinen diğer endokannabinoidler sırasıyla 2-araşidonil gliserol (2-AG), 2-araşidonil gliserol eter (noladin eter), N-araşidonil-dopamin (NADA), ve virodhamin (OAE)'dir (Devane ve ark., 1992; Mechoulam ve ark., 1995; O'Sullivan ve ark., 2004; Porter ve ark., 2002). Endokannabinoid medyatörler hücrede depolanmazlar; aksine hücre membranında lipid prekürsörlerinden sentezlenirler ve spesifik uyarıya cevaben salınırlar (Mechoulam ve ark., 1995).

Akut ve kronik hepatitiste anandamid miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu artış ALT değeriyle korelasyon göstermiştir. Ayrıca, anandamid kronik hepatitis hastalarından alınan doku örneklerinde hepatosellüler apoptozis ve karaciğer fibrozisi meydana gelmiştir. İnsan hepatoma hücrelerinde (HepG2) doza bağımlı

olarak apoptozisi tetiklemiştir. Apoptozisin mekanizması p38mitojen-aktif edilmiş protein kinaz gibi pro-apoptotik yolların aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Maccarrone ve ark., 2000; Mckallip ve ark., 2002). Anandamid hepatosit hasarından kaynaklı oksidatif strese duyarlılığı arttırmaktadır (Biswas ve ark., 2003). Non-pisikotropik kannabinoid (PRS-211,092) farede konkanavalin A tarafından oluşturulan karaciğer hasarını azaltmaktadır. Bunu, interlökin (IL)-6 ve IL-10'un erken gen ekspresyonunu arttırarak, sitokin (SOCS-1 ve 3)'nin baskılayıcısının gen ekspresyonunu tetikleyerek ve IL-2, monosit kemoattractant protein 1 (MCP-1) gibi bir kaç pro-inflamasyon mediyatörünün inhibisyonu ile gerçekleştirmiştir (Lavon ve ark., 2003).

Fitokannabinoidler *Cannabis* cinsi (*Cannabis indica*, *Cannabis sativa* ve *Cannabis ruderalis*) bitkiler tarafından önemli ölçüde üretilirler (Iversen, 2003; Izzo ve Camilleri, 2008). Lif ve tohumu için üretilen *Cannabis* yaygın olarak esrar olarak bilinir (Iversen, 2003). Marijuana bitkisi *C. sativa*, iştahsızlık, kusma, karın ağrısı, mide bağırsak yangısı, ishal, bağırsak yangısı ve diyabetik gastroparezis (mide boşalma güçlüğü) gibi hastalık ve semptomların tedavisinde kullanılır (Izzo ve Camilleri, 2008). Kannabisin ana aktif maddesi Δ^9 -tetrahidrokannabinol (D9-THC), iki membran reseptörü olan CB1 ve CB2'yi aktive eder (Felder ve ark., 1992).

Meydana getirilen sentetik kannabinoidlerin sayısını tahmin etmek oldukça zordur. Onların çoğu endokannabinoidlerin ve fitokannabinoidlerin analoglarıdır. Ancak, bazı yeni bileşikler, doğal olarak meydana gelen bileşikler ile yapısal olarak farklılık gösterir. Ençok kullanılan sentetik kannabinoidler dronabinol, nabilone, rimonabant, JWH-018, JWH-133, dimetilheptilpiren, HU-210 ve WIN 55,212-2'dir (Iversen, 2003).

1.2.2. Endokannabinoid Sistemin Biyosentezi ve Regülasyonu

Endokannabinoidlerin sentezi bu molekülün fizyolojik seviyesini devam ettiren birkaç enzim ile kontrol edilmektedir. AEA'nın seviyesi AEA'yı hücre dışı

boşluktan alan AEA membran transporter (AMT) ile ve hücre içi AEA parçalanmasına katılan “yağ asid amid hidrolaz” (FAAH, fatty acid amide hiydrolase) ile sağlamaktadır (Maccarrone ve ark., 2008). 2-AG’nin biyosentezi ve enzimatik regülasyonu hala tam olarak belirlenememiştir (Elphick ve Egertova, 2001). Monoaçilgliserol lipaz (Monoacylglycerol lipase) 2-AG’nin parçalanmasında önemli bir rola sahip olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Schlosburg ve ark., 2009). Endokannabinoidlerin parçalanmasını sağlayan enzimlerin düzenleyici etkisinin yanısıra, bradikinin veya prostaglandin E₂ gibi diğer mediyatörler ile AEA’nin etkisi ve gücü düzenlenebilir (Singh ve ark., 2005).

1.2.3. Kannabinoid Reseptörlerin Karaciğer Üzerine Etkileri

CB1 reseptörler öncelikle merkezi ve periferel nöronlarda eksprese edilirler. Bağırsaklarda, CB1 reseptörler nörotransmitter madde salınımını düzenlerken, CB2 reseptörler temel olarak immun sistem fonksiyonlarıyla ilişkilidirler (Van Sickle ve ark., 2005). CB2 reseptörler beyinde çok az eksprese edilirler ancak kusmanın işe karıştığı durumlarda beyin bölgesinde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir (Di marzo ve Petrosino, 2007). Birkaç çalışmada proinflatuvar etkisi nadiren tanımlansa da, CB2 reseptörlerin etkili yangı önleyici özelliğine sahip olduğu bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Deveaux ve ark., 2009; Lotersztajn ve ark., 2008; Mallat ve Lotersztajn, 2008). CB2 reseptörleri, ateroskleroz modellerinde ve multiple skleroz, Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nöroyangısal hastalıklarda veya amiyotropik lateral sklerozda yangıyı azaltmıştır (Cabral ve Griffin-Thomas, 2009). Yapılan bir diğer in vitro çalışmada, CB2 reseptör aktivasyonu, makrofajın yükseltgenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL)-kaynaklı yangısal cevap, oksidatif stres, migrasyon ve antijen işleme gibi bir kaç fonksiyonunu bozduğu gözlenmiştir (Cabral ve Griffin-Thomas, 2009).

Endokannabinoid sistem karaciğer hastalıkları gibi çeşitli yangısal hastalıklarda tedavi için yeni bir hedeftir (Gabbay ve ark., 2005). Karaciğer üzerine son zamanlarda yapılan çalışmalar ile akut ve kronik hasardan sonra hem Kupffer

hücreleri hem de karaciğer fibrojenik hücrelerinin uyarıldığı ve bu hücrelerde CB2 reseptör sıklığının arttığı gösterilmiştir (Julien ve ark., 2005; Mallat ve ark., 2007; Teixeira-Clerc ve ark., 2010). Bu hücrelerin uyarılması karaciğerde fibrojenik etkiyi tetiklemektedir. Akut karaciğer hasarında fibrojenik hücrelerde eksprese olan CB2 reseptörlerinin aktivasyonu ise fibrojenik etkiyi azaltarak karaciğer hasarını sınırlandırmıştır. Araştırma sonucu, CB2 reseptör agonistinin hepatosit apoptozisini azalttığı ve karaciğer rejenerasyonunu artırdığı gözlenmiştir (Teixeira-Clerc ve ark., 2010).

CB1 ve CB2 reseptörlerin miktarı (sağlıklı insan karaciğerinde sırasıyla zayıf bir şekilde veya hiç eksprese edilmez) deneysel karaciğer hasarında ve çeşitli nedenlerden kaynaklı karaciğer sirozunda önemli derecede artmaktadır (Batkai ve ark., 2007; Julien ve ark., 2005; Mendez-Sanchez ve ark., 2006; Moezi ve ark., 2006; Munoz-Luque ve ark., 2008; Ros ve ark., 2002; Schwabe ve ark., 2005; Siegmund ve ark., 2007; Teixeira-Clerc ve ark., 2006). Miktar artışı asimetrik şekilli hücreler, yangısal hücreler ve kanal çoğalma hücrelerinde bağ doku boyunca dağılmış paranşimal olmayan hücrelerde meydana gelmektedir. CB2 reseptörler yangısal hücrelerde, safra yolu epiteliyal hücrelerinde, kültür hepatik miyofibroblastlarında, aktive edilmiş hepatik stellat hücrelerinde (HSC) (Julien ve ark., 2005; Siegmund ve ark., 2007) ve alkolik olmayan steatoz ve steatohepatitte hepatositlerde de saptanmıştır (Mendez-Sanchez ve ark., 2006). Yağ Asidi Amid Hidrolaz (FAAH) (anandamidi parçalayan enzim) anandamid kaynaklı hücre ölümlerine tamamen dirençli olan primer hepatositlerde yüksek miktarda eksprese edilirken, anandamid kaynaklı hücre ölümlerine oldukça duyarlı olan primer hepatik stellat hücrelerinde düşük miktarda eksprese edilmiştir (Siegmund ve ark., 2006).

Çeşitli karaciğer hastalıkları ve komplikasyonlarında (hepatitis, fibrozis gibi) CB2 agonistleri ya da CB1 antagonistleri ile kannabinoid sistemin modülasyonunun yararlı etkiler oluşturabildiği görülmektedir (Pacher ve Gao, 2008). Bu gözlem endokannabinoid sistemin farmakolojik modülasyonunun karaciğer hasarlarında değerli bir sağaltım yolağı olabilme olasılığını güçlendirmektedir. CB1 reseptör uyarılması karaciğer dokusunda profibrogenik ve proinflamatuvar etki oluşturmalarına

(Teixeira-Clerc ve ark., 2006) rağmen CB2 reseptörler bu etkiyi engeller, hatta karaciğer fibrojenesisini tersine çevirebilir (Parfieniuk ve Flisiak, 2008). CB2 agonisti JWH-133 karaciğer hasarında antifibrojenik etkisinin yanı sıra karaciğer hasarında koruyucu etki göstermiştir (Teixeira-Clerc ve ark., 2010). Avraham ve ark. (2008), CB2 agonisti HU-308'in karaciğer hasarında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca, HU-308 hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı oksidatif stresi, yangısal cevabı ve hepatositlerde apoptozisi azaltarak koruyucu etki oluşturmuştur (Rajesh ve ark., 2007a). Rajesh ve ark. (2007b), yaptığı diğer çalışmada HU-308 ve JWH-133 CB2 agonistleri ateroskleroz gibi çeşitli yangısal hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. CB1 ve CB2'nin zayıf antagonisti kannabidiol safra kanalı tıkanmış farede bilişsel ve motor zararı azaltmıştır (Magen ve ark., 2009). Başka bir ligand olan andrografolid, kannabinoid reseptörlerini düzenleyerek kolestazis ile oluşturulmuş apoptozise karşı koruyucu etki oluşturmuştur (Lee ve ark., 2010). Kannabinoidlerin kronik karaciğer hastalıklarında klinik etkileri üzerine bilgi sınırlıdır. Kronik hepatit C hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada meydana gelen steatoz ve karaciğer fibrozisinde kannabis (esrar) içmenin katkısının olabileceği düşünülmektedir. Bu etki CB1 ve CB2 reseptör aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Hezode ve ark., 2005).

Hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) oluşturulmadan önce verilen CB2 reseptör agonist HU-308 önemli derecede karaciğer hasarını (alanin aminotransferaz ve laktat dehidrojenaz) ve serum ve doku TNF- α , MIP-1 α , ve MIP-2 seviyesini, doku lipid peroksidasyonu, nötrofil infiltrasyonunu, DNA parçalanmasını ve kaspaz 3 aktivitesini azaltmıştır. Aynı zamanda HU-308, insan karaciğer sinüzodiyal endotelial hücrelerde (HLSECs) TNF- α 'nın tetiklediği ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu ve in vitro HLSEC'lere insan nötrofil yapışmasını azaltmıştır. Bu bulgulara göre, selektif CB2 reseptör agonistleri oksidatif stres ve yangısal cevabı azaltarak I/R hasarına karşı koruyucu etki oluşturabilmektedir (Pacher ve Gao, 2008; Rajesh ve ark., 2007a).

Hepatik stellat hücrelerinde (HSC) endokannabinoidlerin reseptör-bağımlı mekanizmaların dışında hücre ölümüne neden olan AEA ile ilişkili mekanizmanın

varlığı gözlenmiştir. İnsan HSC kültür hücresinin AEA ile muamele edilmesi nekrotik yollar ile hücre ölümünü tetiklemiştir. Bu olay HSC'lerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) formasyonu ve hücre içi Ca^{2+} artışı ile meydana gelmektedir. CB1, CB2 ve vanilloid reseptör-1'in farmakolojik aktivasyonu AEA'nın tetiklediği hücre ölümünü önleyememiştir. Ayrıca, bu analizlerin sonucu, AEA HSC proliferasyonun baskılanması ve nekrotik ölümü tetiklemesi ile antifibrojenik etki oluşturmuştur. Ancak, psikoaktif etkileri ve sistemik vazodilatasyonun yanı sıra nekroze ve doku hasarına karşı lokal yangıyı tetiklemesi gibi dezavantajları yüzünden AEA'nın karaciğer fibrozisinde tedavi amaçlı kullanımı kısıtlıdır (Siegmund ve ark., 2005). Kannabinoidlerin istenmeyen yan etkilerinden kaçınmak için bazı yaklaşımlar denenmektedir. Bunlar: kan beyin bariyerini geçemeyen selektif CB1 agonistleri; veya CB2 selektif agonist (CB2 reseptörleri beyinde yok denilebilecek kadar azdır); merkezi etki oluşturmadan lokal CB1 reseptörler üzerine etki oluşturabilmek için doku anandamide seviyesini arttıran inhibitörlerin kullanımıdır (örneğin, FAAH inhibitör ve endokannabinoidlerin tekrar alımını engelleyenler) (Izzo ve Camilleri, 2008).

Deneyssel ve insan çalışmaları, pankreas, karaciğer ve mide bağırsak sisteminde kannabinoid mekanizmaların kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir. Kannabinoidlerin periferik olarak hareketlilik, duyarlılık, salgılama, yangı, doku üremesi, karsinojenik ve fibrojenik ve merkezi olarak doyum, iştah ve öfori gibi etkileri vardır. Kannabinoidlerin bu etkileri çeşitli fonksiyonel, yangısal ve neoplastik hastalıklarda kullanılmasına neden olmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda modern farmakolojik prensip uygulamalarının, periferik kannabinoid sistemin selektif modülasyonunu genişleteceğine inanılmaktadır. CB1 antagonist ve rimonabant, obezite ve bununla ilgili metabolik fonksiyon bozukluklarının tedavisinde kullanılan ilk selektif kannabinoid modulatorlerdir. Bu ilaçların neoplazi, fibrogenesis, mide bağırsak ve hepatik hastalıklarla ilişkili yangılarda önemli bir etkisi olduğuna inanılmaktadır (Izzo ve Camilleri, 2008).

Akut ya da kronik maruziyete bağlı olarak memeli karaciğerinde zararlı etkiye neden olan sipermetrinin, son yıllarda yapılan araştırmalara göre farklı toksik

etkilerinin (özellikle kronik toksikasyona bağlı) ortaya konması, toksik etkilerinin tedavisinde bilinen spesifik antidotlarının bulunmaması, etkinliklerinde farklı yolların da söz konusu olabileceği fikrini akla getirmektedir. Sipermetrin toksikasyonunda karaciğerde meydana gelen zararlı etkiye yönelik endokannabinoid sistemin davranışı konusunda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Önceden yapılan diğer maddelerle ilgili araştırma sonuçlarından hareketle, sipermetrinin karaciğer toksik etkisine karşı endokannabinoid sistemin aktif hale geçebileceği düşünülmektedir. CB2 agonisti JWH-133 ligandının yapılan çalışmalarda çeşitli etiyolojilerden kaynaklı karaciğer hasarlarında koruyucu etkisi gözlenmesi, vücutta yan etkilerinin çok az olması ve psikotik etkilerinin olmaması gibi nedenlerle bu çalışmada kullanımı tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, sıçanlarda subakut sipermetrin toksisitesi ile oluşturulan karaciğer hasarında CB2 reseptör ekspresyonu, RT-PCR ve İmmunohistokimya ile oluşturulan hasara karşı kannabinoid reseptör 2 agonisti JWH-133'ün etkisini ise karaciğer fonksiyon testleri, oksidatif stres parametreleri ve histopatolojik bakı ile incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Kannabinoid reseptör 2 agonisti JWH-133 (Axon),
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma),
Mısır yağı (Sigma-Aldrich, C8267)
PCR için prob ve primerler (Ella Biotech),
Sipermetrin (Alfa Aeaser, LabMix, % 95),
RIPA tamponu (Cayman, 100110263),
Glutathion Peroxidase Kit (Cayman, 703102),
Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman, 706002),
TBARS Assay Kit (Cayman, 100009055),
Anti-kannabinoid reseptör II antikor (Abcam; ab45942),
Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam; ab64261),
Antibody Diluent (Abcam; ab64211),
Sitat tamponu pH 7,4 (Abcam; ab64236),
Hidrojen peroksit (Abcam, ab64261),
Streptavidin (Abcam; ab64261),
TBS (pH 7,4) (Abcam; ab64248),
Mounting Medium (Abcam, ab64230),
Mayer's Hematoksilen (Abcam; ab128990),
GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific; cat. K0731)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific; cat. K1621),
Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific; cat. K0261),
PBS (Sigma-Aldrich, D8537)
AEC (Thermo scientific; TA125HA)
Protein Block (Abcam, ab64261)

Total Protein Kit (Erba; cat. BLT00054)
TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, P1379)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

QRT-PCR cihazı (QIAGEN Rotor-Gene P),
Spektrofotometre (Shimadzu),
Mikroskop (Leica DM2500),
Ototeknikom (Leica TP1020)
Mikrotom (Leica)
Lamel (Abcam),
Lam, Polylysine (Abcam),

2.1.3. Hayvan Materyali

Araştırma, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Biriminden sağlanan 8-12 haftalık, 180-240 gram canlı ağırlıktaki 44 adet erkek sıçanda (Wistar Albino) gerçekleştirildi. Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık siklusu ayarlanabilir odalarda uygun nem ve ısıda bakıldı. Sıçanlar uygulamadan önce 5 gün karantinada bekletildi. Uygulama öncesi ve sırasında standart sıçan besleme uygulaması yapıldı ve su ad libitum olarak verildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Etik

Araştırma, T.C. Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27/08/2014 tarihli toplantısında alınan (Toplantı no: 2014-16, Dosya no: 2014-91) 2014-16-104 no'lu karar çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Denemeye başlamadan önce 44 sıçandan 6 tanesi rastgele seçilerek sakrifiye edildi. Alınan karaciğer ve kan örneklerinin analiz sonuçları tüm hayvanların Negatif Kontrol Grubu (NK Grubu) değeri olarak kullanıldı. Bu işlemten sonra hayvanlar 4 gruba ayrılarak denemeler 4 Grup üzerinden (Çizelge 2.1) gerçekleştirildi. Grup 1 ve Grup 4'te 7 ve Grup 2 ve Grup 3'te 12 sıçan bulunduruldu. Denemelerde Grup 1 genel kontrol olarak seçildi ve son 4 gün sadece agonisti çözündürmede kullanılan taşıt (0,1 ml DMSO içine 1 damla Tween 20) (i.p.) ile 14 gün mısır yağı (sipermetrinin taşıtı) (po) uygulandı. Grup 2'ye sipermetrin ÖD₅₀ dozunun 1/3 oranında (125 mg/kg /1 ml mısır yağ/gün, po) (Yavaşoğlu ve ark., 2006) 14 gün ve son 4 gün (11., 12., 13. ve 14. gün) sadece 0,1 ml/gün (ip) taşıt uygulandı (Aldana ve ark., 2001). Grup 3'e sipermetrin 14 gün ÖD₅₀ dozunun 1/3'ü oranında (125 mg/kg /1ml mısır yağ/gün, po) ve son 4 gün CB2 agonist olan JWH-133 (3 mg/kg /0,1ml taşıt/gün, ip) uygulandı (Deveaux ve ark., 2009; Elmes ve ark., 2005; Huffman ve ark., 1999). Grup 4'e 14 gün sadece mısır yağ (1ml /gün, po)+ son 4 gün JWH-133 (3 mg/kg /0,1ml taşıt/gün, ip) uygulandı (Giray ve ark., 2001).

Çizelge 2.1. Sipermetrin ve JWH-133'ün Gruplara Uygulanması.

Gruplar	Uygulama
Grup 1 (n:7)	Mısır yağ** (14 gün, po) + Taşıt* (son 4 gün, ip)
Grup 2 (n:12)	Sipermetrin (14 gün, po) + Taşıt (son 4 gün, ip)
Grup 3 (n:12)	Sipermetrin (14 gün, po) + JWH-133 (son 4 gün, ip)
Grup 4 (n:7)	Mısır yağ (14 gün, po)+ JWH-133 (son 4 gün, ip)

*Taşıt: 0,1 ml Dimetilsülfoksit içine 1 damla Tween 20 karışımından oluşur ve JWH-133 maddesinin taşıtıdır.

** Mısır yağ: Sipermetrin maddesinin taşıtıdır

Ip: intraperitoneal, periton içi po: peros, ağızdan

Uygulamaya başlamadan önce 6 sıçandan kan alınarak karaciğer fonksiyon parametrelerine bakıldı. Geriye kalan sıçanlara Çizelge 2.1'de belirtildiği ve yukarıda anlatıldığı şekilde ilaç uygulamaları devam etti ve hayvanlar 14. günün sonunda eter anesteziye alınarak dekapite edilmeden önce kan örnekleri alındı, sonrasında sakrifiye edildi. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra karaciğerleri alındı, testin

durumuna göre tamponlu formalinde fikse edildi ya da -80 °C'de analizleri yapılmıncaya kadar bekletildi.

2.2.3. Morfometrik Parametreler

Çalışmanın başından sonuna kadar her gün sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Çalışmanın sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan alınan karaciğer dokularının ağırlıkları ölçüldü. Relatif karaciğer ağırlıkları hesaplandı (karaciğer ağırlığı/canlı ağırlık). Denemeler boyunca sıçanlardaki tüm klinik bulgular gözlemlendi. Sakrifiye edilen hayvanlar için detaylı ölüm sonrası (postmortem) inceleme yapıldı ve büyük lezyonlar not edildi.

2.2.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

İlk gün (n:6) ve çalışmanın sonunda (n:32) hayvanlar eter ile anesteziye alındıktan sonra kalplerinden 1 ml civarında kan alındı ve 4000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Serumlar Düzen laboratuvarlarında alanin transaminaz (ALT) ve aspartat transaminaz (AST), alkalın fosfataz (ALP), laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi ve glukoz yönünden incelendi.

2.2.5. Oksidatif Stres Parametreleri

Karaciğer dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz ve MDA parametrelerine bakıldı. Karaciğer parçalanmadan önce PBS ile yıkandı ve sonrasında homojenizasyon tamponu ile homojenize edildi. Homojenize edilen doku santrifüje edilerek supernatantlar analiz için kullanıldı. Bu enzimlere; Glutasyon peroksidaz için Paglia ve Valentine (1967) tarafından bildirilen yöntemle göre Glutathion Peroxidase Kit (Cayman, 703102) ile; Süperoksit dismutaz için Sun ve ark. (1995) tarafından geliştirilen yöntemle göre Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman, 706002) ile; MDA için ise Ohkawa ve ark. (1979)'nın geliştirdiği yöntemle

göre TBARS Assay Kit (Cayman, 100009055) ile ve kit protokollerine (Cayman) uygun olarak yapıldı. Ayrıca, tüm örneklerin protein miktarı Total Protein Kiti (Erba; cat. BLT00054) ile otoanalizörde (Erba XL 600, Meinheim Germany) ölçüldü.

2.2.5.1. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

Homojenizasyon tamponu (pH 7,4): 86,0 g sakkaroz, 0,372 g EDTA, 0,606 g Tris tartılarak 1 litre tridistile suda çözündürüldü ve pH 7,4'e ayarlandı.

Homojenizasyonun Yapılışı: Örnekler -80 °C'den çıkartılarak +4 °C'de çözündürüldü. Süzgeç kağıdı ile kurulandıktan sonra 300 mg tartıldı. Tartılan karaciğer dokusu cam tüpe aktarıldı. Üzerine 3 ml homojenizasyon tamponu eklendi. Ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus UW 3100) yardımıyla 5 dakika boyunca homojenize edildi (%50 güçte 5 saniye +, 3 saniye -). 2000 g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüje edildi. Süpernatantlar başka santrifüj tüpüne aktarıldı. 12 000 g'de bir kez daha santrifüje edildi. Analizleri gerçekleştirilene kadar süpernatantlar -80 °C'de saklandı.

Yapılışı:

Okuma yapılacak plate üzerinde 3 kuyucuk background (zemin) olarak seçildi, 3 kuyucuk daha pozitif kontrol olarak seçildi. Diğer kuyucuklarda örnekler için kullanıldı.

1. Background plate kuyucuğu- 3 kuyucuğa 120 µl assay buffer ve co-substrate karışımı eklendi.
2. Pozitif kontrol kuyucukları- 3 kuyucuğa 100 µl assay buffer, 50 µl co-substrate karışımı ve 20 µl seyreltilmiş GPx (kontrol) eklendi.
3. Örnek kuyucukları- her örnek için 3 kuyucuğa 100 µl assay buffer, 50 µl co-substrate karışımı ve 20 µl örnek eklendi.

4. Her kuyucuğa reaksiyonu başlatmak için mümkün olduğunca çabuk 20 µl kümen hidroperoksit eklendi.
5. Plate hafif şekilde birkaç saniye çalkalandı.
6. Örnekler ve kontroller 340 nm’de her 10 saniyede bir 6 kez okutuldu.
7. Hesaplama GPx Assay Kit (703102)’ te belirtilen fomüle göre yapıldı.

GPx aktivite: $\Delta A_{340}/\text{min.} / 0,00373 \text{ uM}^{-1} \times 0,19 \text{ ml}/0,02 \text{ ml} \times \text{sample dilution}$

2.2.5.2. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

Homojenizasyon Tamponu: 50 mmol/L KH_2PO_4 ve 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 1 litre tridistile suda çözündürüldü ve pH’sı 7,8 e ayarlandı. Üzerine Tween 20 (% 0,5) eklendi.

Homojenizasyonun Yapılışı: Örnekler -80 °C’den çıkartılarak +4 °C’de çözündürüldü. Süzgeç kâğıdı ile kurulandıktan sonra 300 mg tartıldı. Tartılan karaciğer dokusu cam tüpe aktarıldı ve üzerine 3 ml homojenizasyon tamponu eklendi. Ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus UW 3100) yardımıyla 5 dakika boyunca homojenize edildi (%50 güçte 5 saniye +, 3 saniye -). 2000 g’de 10 dakika +4 °C’de santrifüje edildi. Süpernatantlar başka santrifüj tüpüne aktarıldı. 12 000 g’de bir kez daha santrifüje edildi ve süpernantlar analiz edilinceye kadar -80 °C’de saklandı.

Testin yapılışı:

1. SOD standart kuyucukları- 20 µl SOD standartta 1,98 ml sample buffer eklenerek standart stok oluşturuldu. Kuyucuklara (A-G) 200 µl seyreltilmiş Radical Detector ve 10 µl standartlar (stoktan 0, 20, 40, 80, 120, 160 ve 200 µl) konuldu.
2. Örnek kuyucukları- her kuyucuğa 200 µl seyreltilmiş Radical Detector ve 10 µl örnek konuldu.
3. Reaksiyonu başlatmak için 20 µl seyreltilmiş ksantin oksidaz eklendi.

4. Oda ısısında 30 dakika horizontal karıştırıcıda dikkatlice inkube edildi.
5. Plate reader'de 440 nm'de okutuldu.
6. Hesaplama SOD Assay Kit'te (706002) belirtilen formüle göre yapıldı.

SOD (U/ml): $[(\text{sample LR- y-intercept}) / \text{Slope}] \times (0,23 \text{ ml} / 0,01 \text{ ml}) \times \text{sample dilution}$

2.2.5.3. MDA Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

Homojenizasyon Tamponu: RIPA buffer (Cayman; cat: 100010263) kullanıldı.

Homojenizasyonun Yapılışı: Örnekler -80 °C'den çıkartılarak +4 °C'de çözündürüldü. Süzgeç kâğıdı ile kurulandıktan sonra 300 mg tartıldı. Tartılan karaciğer dokusu cam tüpe aktarıldı ve üzerine 3 ml homojenizasyon tamponu eklendi. Ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus UW 3100) yardımıyla 5 dakika boyunca homojenize edildi (%50 güçte 5 saniye +, 3 saniye -). 2000 g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüje edildi. Süpernatantlar başka santrifüj tüpüne aktarıldı. 12 000 g'de bir kez daha santrifüje edildi. Süpernantlar -80 °C'de saklandı.

Testin Yapılışı:

250 µl MDA Standartına 750 µl su eklenerek 125 µM stok solüsyon oluşturuldu.

1. Standartlar (0, 0,625, 1,125, 2,5, 5, 10, 25 ve 50 µM) ve örnekler 5 ml'lik viallere 100 µl eklendi.
2. 10 µl SDS solüsyonu viallere eklendi.
3. 4 ml Color Reagent her vial eklendi.
4. Bu vialler kaynayan suya bir saatliğine bırakıldı.
5. Bir saatin sonunda vialler alındı ve reaksiyonu durdurmak için hemen buza konuldu. 10 dakika buzda bekletildi.
6. 10. dakikanın sonunda 1,600 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüje edildi.

7. Vialler 30 dakika oda ısısında bekletildi.
8. Her vialden 150 µl plate kuyucuklarına konuldu. Plate readerda 530 nm'de okutuldu.
9. Hesaplama TBARS Assay Kit'te (10009055) belirtilen formüle göre yapıldı.

MDA (µM): [(ölçülen absorbans)- (y-intercept)/slope]

2.2.6. Histopatolojik inceleme

Çalışmaya başlandığı gün 6 sıçan rastgele seçildi ve sakrifiye edildi. Çalışmanın sonunda Grup 1'den 7 hayvan, Grup 2'den 9 hayvan, Grup 3'ten 9 hayvan ve Grup 4'ten 7 hayvan sakrifiye edildi. Her hayvanın karaciğer dokuları alınarak histopatolojik inceleme için %10 tamponlu formalinde 24 saat tespit edildi. Dokulara rutin histolojik prosedür Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda doku takip cihazında (ototeknikom) (Leica, Tp1020) gerçekleştirildi. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom (Leica, RM2145) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Oluşturulan preparatlar hematoksilin&eosin ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopta subjektif olarak incelendi. Parankim dejenerasyonu ve nekroz şiddetine göre negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak skorlandırıldı.

2.2.7. Immunohistokimya

Çalışmaya başlandığı gün 6 sıçan (Negatif Kontrol Grubu, NKG) ve çalışmanın sonunda Grup 1 ve Grup 4'ten 7 hayvan, Grup 2 ve Grup 3'ten 9 hayvan sakrifiye edildi. Her hayvanın karaciğer dokuları alınarak inceleme için %10 tamponlu formalinde 24 saat bekletildi. Sonrasında rutin histolojik takip, yukarıdaki histopatolojik prosedürle birlikte tamamlandı. Blokajı yapılan karaciğer dokularından mikrotom (Leica rm 2145) ile 5 µm kalınlıkta kesitler polilizinli lamalar

(Sigma) üzerine alındı. Kesitler 30 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra etüve kaldırıldı.

Deparafinizasyon işleminde kesitler öncelikle 55 °C'de 30 dakika etüvde tutulduktan sonra, 15 dakika kadar soğumaya bırakıldı. Sonrasında ksilolde 2x10 dakika bekletildi. Ksilolü uzaklaştırmak için dereceli alkollerde 3'er dakika (absolut alkol %96, %80 ve %70 alkol) tutuldu. Distile suda 5 dakika tutulduktan sonra, kesitler 2x5 dakika TBS (abcam, ab64248) ile muamele edildi. Mikrodalga fırında 200 ml %10 sitrat buffer'da (Abcam, ab64236) 20 dakika 800 watt'a antijen retrieval işlemi yapıldı. Her 5 dakikada buharlaşan sıvı için daha önceden mikrodalgada kaynatılan distile su eklendi. Daha sonra oda ısısına gelinceye kadar bekletildi. Distile su ile 2x2,5 dakika yıkandı. Ardından 3x5 dakika TBS ile yıkandı. Endojen peroksit inhibisyonu taze hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksit (Abcam, ab64261) ile karanlık ortamda 20 dakikada gerçekleştirildi. TBS ile 3x5 dakika yıkanan kesitlerin etrafı pappen ile çizildi. Protein Block (Abcam, ab64261) 10 dakika karanlık ortamda bovine serum albuminde bekletildi. Ardından yıkama yapılmadan 1:100 oranında sulandırılmış Primer Antikorlar (Abcam, Rabbit Polyclonal IgG, ab45942) eklenerek 1 gece 4 °C buzdolabında beklenildi. Ertesi gün 3x5 dakika TBS ile yıkandı. Biotinli sekonder antikor (Abcam, Rabbit spesifik HRP/AEC, ab64261) nem kamerasında 30 dakika muamele edildi. TBS ile 3x5 dakika yıkandı. Streptavidin (*Streptavidin*-HRP/AEC, ab64261) 30 dakika oda sıcaklığında muamele edildi. TBS ile 3x5 dakika yıkama yapılarak reaksiyonun ortaya çıkarılacağı kromojen solüsyonunun uygulamasına geçildi. AEC (3-amino-9 ethylcarbazole) (Thermo Scientific, ta125ha) ile mikroskop altında kontrollü bir şekilde yaklaşık 1 dakika muamele edildi. Kromojenin uzaklaştırılması 2x5 dakika distile su ile sağlandı. Kontrast boyaması Mayer's hematoksilen (abcam; ab128990) ile yaklaşık 40 saniye kadar tutuldu arkasından 10-15 dakika çeşme suyunda yıkandı. Mounting medium (Abcam, ab64230) kullanarak lamel ile kapatıldı ve Leica DM 2500 araştırma mikroskobu ile fotoğrafları çekildi. Reaksiyonlar immunpozitivitenin şiddetine göre negatif (-), çok zayıf (+), zayıf (++), orta (+++) ve kuvvetli (++++) olarak skorlandırıldı.

2.2.8. CB2 mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Ölçülmesi

CB2 mRNA ekspresyon düzeylerine karaciğer dokusunda Quantitative Real time PCR yöntemi ile QIAGEN Rotor-Gene P cihazı kullanılarak bakıldı.

Çizelge 2.2. QRT-PCR için Forward ve Reverse Primerler, Probe ve Kontrol Dizilimi (*Rattus norvegicus* CB2 reseptör; GenBank no. AF286721).

Gen	Dizi (5'-3')	Bazlar
Forward	5'-TGACTGCTGTTGACCGATACCT -3'	525-546
Reverse	5'-GCCGAGAGGACCCACATG -3'	633-616
Probe	5'-Fam-CTACCTACAAAGCTCTCGTCACCCGTGG-Tamra-3'	564-591
Pozitif kontrol	TGACTGCTGTTGACCGATACCTATGTCTGTGCTACCCACCTAC CTACAAAGCTCTCGTCACCCGTGGGAGGGCACTGGTGGCCCTT GGTGTCTATGTGGGTCTCTCGGC	

Total RNA, karaciğerden üretici firmanın (Thermo) protokolüne göre Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (cat. #K0731) kullanılarak ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen total RNA, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) ile cDNA'ya çevrilerek ve Çizelge 2.2'deki primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmada daha önce tasarlanmış olan primerler ve problemler kullanıldı (Beltramo ve ark., 2006). QRT-PCR Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific) ile yapıldı. FAM/TAMRA işaretli prob kullanıldı (Çizelge 2.2). QRT-PCR analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

QRT-PCR için forward ve reverse primerler, probe ve kontrol kannabinoid reseptör 2 gen bölgesinde boyandı (Çizelge 2.3)

Çizelge 2.3. Sıçan (*Rattus norvegicus*) kannabinoid reseptör 2 geni (GenBank no. AF286721).

TCCTACGTGGTGGTCCTGTCCAGGTCTCCAGATCTAAATACAAAATAGCCAGGACAAGGC TTCACAAGACCCTGGAGGCCAGCGGCTGACAAATGACTCCCAGTCCTCCGGAACAGCTC CGGTAGAAGCAGCCAAAGCCTGTCTGTCCATGGCGGGATGCCGGGAGCTGGAGTTGACC AACGGCTCCAATGGCGGCTTGGAGTTCAACCCTATGAAGGAGTACATGATCTTGAGTGAT GCGCAGCAGATCGCTGTGGCGGTGCTGTGTACCCTGATGGGGCTGCTGAGTGCCCTGGAG AACGTGGCTGTGCTCTATCTCATCCTGTCCTCGCAGCGGCTCCGCAGGAAGCCCTCGTAC
--

CTGTTTCATCGGTAGCTTGGCCGGAGCTGACTTCCTGGCCAGCGTGATCTTTGCCTGCAACT
TCGTCATCTTCCATGTCTTTCACGGTGTGGACTCCAGGAATATCTTCCTGTTGAAGATCGG
CAGCGTGACCATGACCTTCACGGCCTCTGTGGGCAGCCTGCTGCT**GACTGCTGTTGACCG**
ATACCTATGTCTGTGCTACCCACCTACCTACAAAGCTCTCGTCACCCGTGGGAGGGCACTG
GTGGCCCTTGGTGTATGTGGGTCTCTCGGCGTTGATCTCCTACCTACCGCTCATGGGGT
GGAATTGTTGTCCTAGTCCCTGTTCTGAACTTTTCCCCCTGATCCCCAACGACTACCTCCT
GGGCTGGCTTCTTTTCATTGCCATCCTCTTTTCTGGCATCATCTATACCTATGGGTATGTCC
TCTGGAAAGCACACCAACATGTAGCCAGCTTGACTGAGCACCAGGACAGGCAGGTGCCT
GGGATAGCTCGGATGCGGCTAGACGTGAGGTTGGCCAAGACTCTGGGCCTGGTCATGGC
TGTTCTGCTCATATGCTGGTTCCTGCACTGGCTCTCATGGGCCATAGCCTGGTCACCACA
CTGAGTGACAAGGTCAAGGAGGCCTTCGCCTTCTGCTCCATGCTGTGCCTTGTTAACTCC
ATGATCAATCCTATCATTTATGCCCTGCGGAGTGAGAGATCCGCTCTGCTGCCCAGCAC
TGCCTGACAGGCTGGAAGAAATATCTCCAGGGCCTCGGATCTGAGGGGAAAGAAGAAGC
CCCAAAGTCCCTCAGTTACAGAGACAGAGGCTGAGGTGAAAACCACCACAGGGCCGGGAT
CCAGAACACCAGGCTGCTCCAATTGCTGATACGGCCTGTCTTTCTATGGAAGCAGTCCGA
GTCAGAAGTCAGGTCACTCCCTCCAGAAGAGAGGGGTCTGGACCCTGAATATTTCTGAA
GCCAGCTCTAGGGTAATGGAAACAGAACTTCCCACCCCTTTTTTTGCTAATGAGTGCTG
GGGTTTCATGGCTGGAAGACGGCCTGGTCTTGCCTACCTTACGCAGTCTGTGGAGAGGGGC
CTGTAAAAATGGCGGGCTCTGTTACATCAAATCGGGAAACCTCCTGACTCCAGAAACC
TAGAGGCCAGAGGGGCCTCCAGGGACGATAATGAAGGACTCAGGGGATCTGTGAAGAC
AAGGGACCTGTTCTCCTGGAATCTAGGCTACCCCGGCTGTGAGGCCTCTGCCCACGACTT
CACAGATGTCCATATCTTCCACAGTGTGGGTTCTAGGCCGCCCTGCTGAAGATGGATAGC
AAGACCAGCTATTTCTGGTTCCTGCTTCACTGATTGGAACCTCTGTGGCTGTAGGGCGATG
TGACCTTCAGGCCACCCTTGCCTCTTGAGGATCAAGAATTATGATGTGCTGAGGACCAAG
GAGGTTCACTCTCTCCCTTCAGACAGAGCCATGTGCTGTCAGCTCAGGGTATCTTGTTGTT
GGAACAGGACCCTCCTGATAGCCCGATAAGCCTTGAAAATCATTATGACTTTAGGTCCTT
GGGGACCCACGGGAAGCCAGGTTCACTTGAGGTACAGAGTCCTCAGAGAACTGTATGGA
CCTTGTGACCTTCTGCTGTGTCTCCCATAGCAGTATCCCAGTCCAGCCTAGCTTCAGTAA
AATCAAGGTATTCACAAAGAGTCTTTGGGTTCTAGATTGTTCTAGTGATGCTCAACTCA
GCTTCCCTTGCCCTTCCAGACTCTGGTCTGAAGGATAAGCAGGAGTTGGGAGGAGACT
GCCTGCTGCGGACATCCTCGATCCACAGCCCCATGCTGTCTCTGGGTACCTGCATTTTACC
TTCAGCAAAGGTTGCATTCCCAACAGACGGAGGTTCAAGGCGCTGCTGGTGGTAGGGGT
AGGTAGCACTGGGGACCGCAGACACGGTGAAAGGAAAACCCTCTAACACTTTCTACTTTT
GCTTTTAGCAGATTCAGCCAACAGACAAGACGTCCGTCCCCATTGCCCAGAGGAACTAAC
ATGGTGGTGTTCAGTGAGAAGACCAATCAGCCTCCCTAATAAAGCAGGGCAGTCCACTCT
GCTATAAACCTCTCACATGCTTCTGCAGGAGGACATTTTGTCTTCTGTTAAGGTCAAG
TGAAGGTCACAGTGTCTCATTTTATTCTTCCCAAGACAAGTTCTGTGCATCAAAAGCTGCT
GCAAATTCTACTCTAATCGCTATGTGGGAGGACTCGGGGAAGAAGTTGATTTCGTCTGGGC

TTTGTGTTTTAGACCGTATTTCAACATACACTTGGGAAGGAAGAACCAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

Pozitif Kontrolün Hazırlanması:

Kontrol DNA'ları Sentegen firmasından satın alındı. Çevirmeli kapaklı mikrosantrifüj tüpünde 4 µg liyofilize plazmid DNA üzerine 100 µl Nükleaz İçermeyen Su (NİS) eklenerek 40 ng/µl konsantrasyon elde edildi.

Primer ve Probe Hazırlanması:

FRW: tüpte 200 nmol liyofilize halde bulunmaktadır. Üzerine 1050 µl NİS eklendi. Hazırlanan ana stoktan 1 µl alınarak, üzerine 9 µl NİS eklenerek dilue edildi.

RVR: tüpte 200 nmol liyofilize halde bulunmaktadır. Üzerine 1014 µl NİS eklendi. Hazırlanan stoktan 1 µl alınarak 9 µl NİS'ye eklenerek dilue edildi.

PROBE: Tüpte 200 nmol liyofilize halde bulunmaktadır. Üzeine 167 µl NİS eklendi. Hazırlanan ana stoktan 1 µl alınarak 9 µl NİS ye eklenerek dilue edildi.

Sentegen firmasından satın alınan pozitif kontrol olarak kullanılacak Liyofilize plazmid DNA'nın çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için ön denemeler yapıldı.

Bunun için;

3 farklı dozda pozitif kontrol standart oluşturuldu ve 2 tane negatif kontrol kullanıldı. Standartların miktarları Çizelge 2.4'te verildi.

Çizelge 2.4. Gene Rotor PCR Cihazına 1 Godeye Konulan Maddelerin Miktarları.

Numune İsim	Mix (µl)	Enzim (µl, ROX)	Kontrol (ng/Reac.)	Nükleaz içermeyen su	*Numune	Toplam
Standart 1	12,5 µl	0,25 µl	1 µl (40ng/µl)	9,25 µl	-	25 µl

Standart 2	12,5 µl	0,25 µl	2 µl (80 ng/µl)	8,25 µl	-	25 µl
Standart 3	12,5 µl	0,25 µl	3 µl (120 ng/µl)	7,25 µl	-	25 µl
Negatif Kont	12,5 µl	0,25 µl	-	10,25 µl	-	25 µl
Negatif Kont	12,5 µl	0,25 µl	-	10,25 µl	-	25 µl

*Numunelerden elde edilen cDNA 5 ul miktarında konulması gerekir. Ancak burada numune yerine NİS konuldu.

**ROX enzimine Kullandığımız cihazda gerek olmadığı için ilerleyen çalışmalarda kullanılmadı.

Ön çalışmanın sonunda pozitif kontrollerin çalıştığı tespit edildi.

Standart Eğrinin Çizdirilmesi

Standart eğriyi çizdirmek için 9 farklı doz seçildi. Log 10'a göre seyreltilmiş 9 farklı standart doz (Çizelge 2.5) hazırlanarak standart eğri çizdirildi.

Log 10'a göre standartların hazırlanması: 9 tüpe 90'ar µl NİS konuldu, birinci tüpe 40 ng/µl konsantrasyonundaki standart stoktan 10 µl eklendi. Birinci standarttan 10 µl alınarak ikincisine eklenerek log 10'a göre seyreltme yapıldı. Bir önceki seyreltme basamağından 10 µl alınıp bir sonrakine eklenerek log 10'a göre seyreltme yapıldı.

Çizelge 2.5. Dokuz Farklı Standart Dozu (log 10'a göre yapıldı).

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8	Std 9
Mix (µl)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Kontrol (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
FRW (µl)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
RVR (µl)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
PROBE (µl)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
NİS (µl)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Standartlarda oluşan konsantrasyon	20 ng	2 ng	0,2 ng	0,02 ng	0,002 ng	0,2 pg	0,02 pg	0,002 pg	0,2 fg

Pipetler küçük miktarlar için kullanıldığında hata payının yüksek olmasından dolayı standartların dışındaki diğer maddeler yüksek miktarlarda hazırlanıp sonrasında ayrı tüplere 20 şer µl eşit biçimde paylaştırıldı (her bir maddeden 12 katı kadar hazırlandı). Denemede 2 adet negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrolde örnek (template) yerine NİS konuldu.

Cihaz programı: 50 °C’de 2 dakika; 95 °C’de 10 dakika bir kez ve 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 1 dakika 40 siklus yapıldı (Beltramo ve ark., 2006). Standart 4, 5, 6 ve 7’nin standart eğri çizdirmek için uygun konsantrasyonlar olduğu belirlendi.

Örneklerden Total RNA Ekstraksiyonu

Örneklerin tümünden RNA ekstraksiyonu yapılmadan önce Grup 3 ve Grup 4’den birer numune ile Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit’in kontrolü yapıldı (Çizelge 2.6). Ekstrakte edilen total RNA miktarı Nanodrop (Thermo NanoDrop 2000) cihazında ölçüldü. Sonuçlara göre kitin sağlıklı çalıştığı doğrulandı.

Çizelge 2.6. GeneJET RNA Purifikasyon Kit İçeriği.

Gene JET RNA Purifikasyon Kiti	50 örnek için
Proteinaz K	600 µl
Lizis buffer	40 ml
Yıkama tamponu 1 (konsantre)	40 ml
Yıkama tamponu 2 (konsantre)	23 ml
Su, nükleaz ari	30 ml
Purifikasyon kolonu + toplama kolonu	50 adet
Toplama kolonu (2 ml)	50 adet
Toplama kolonu (1,5 ml)	50 adet

Kit İçin Buffer’ların Hazırlanması:

- TE (Tris-EDTA) buffer:

Proteinaz K'yı sulandırmak için kullanılır. TE tamponunun amacı RNA'nın parçalanmasını engellemektir. TE buffer'ı oluşturan bileşenler Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. TE Buffer Hazırlanmasında Kullanılan Bileşenlerin Miktarı

Bileşik	500 ml TE buffer için
1 M Tris pH 8	5 ml
0,5 EDTA pH 8	1 ml
dH ₂ O	494 ml

1M Tris;

Tris (hydroxymethyl) aminomethane

Molekül ağırlığı: 121,4 g/mol

0,5 L su için 60,57 g

HCl kullanarak pH 8 çekildi.

0,5 EDTA;

Diaminoethane Tetraacetic acid

Molekül ağırlığı: 372,2 g/mol

100 ml suda 18,6 g

NaOH kullanarak pH 8'e çekildi.

Not: EDTA pH 8 oluncaya kadar çözülmedi.

TE tamponu yukarıda anlatıldığı gibi hazırlandıktan (Çizelge 2.6) sonra otoklavlandı. Kısa süreli kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.

- Lizis buffer:

Kitte bulunan lizis buffer'a her bir mililitresi için 14,3 molar 2-merkaptetanol'den 20 µl eklendi.

- Yıkama tamponu 1 (wash buffer 1):

40 ml'lik konsantre yıkama tamponu 1'e (kitte var) etanol (%96-100)'den 10 ml eklendi.

- Yıkama tamponu 2 (wash buffer 2):

23 ml'lik konsantre yıkama tamponu 2'ye (kitte var) etanol (%96-100)'den 39 ml eklendi.

Kit kılavuzuna göre proteinaz K -20 °C'de saklandı. Kullanımdan sonra tekrar -20 °C'de saklandı. Diğer maddeler 15-25 °C'de saklandı.

Ekstraksiyonun Yapılışı

1. Bir gün öncesinde ekstraksiyonda kullanılacak malzemeler %10 sodyum hipoklorid ile muamale edildi. Arkasından Sodyum hipokloridin koreziv etkisini azaltmak için %70'lik alkol ile malzemeler temizlendi. Gece boyunca UV ışık altında bekletildi. Pipet uçları otoklavda 1,5 saat bekletildi. Hayvanların sakrifiye edilmesinden hemen sonra karaciğerden alınan dokular isimlendirilerek, -80 °C'de saklandı. Ekstraksiyondan hemen önce çıkartılan dokulardan 30 mg alınarak, 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Ölçüm ve parçalama işlemleri buzun üzerinde yapıldı. Ucu küt enjeksiyon iğneleri ile doku parçası ezildi. Üzerine 300 µl Lizis buffer eklendi. 10 saniye vortekslendi.

2. Üzerine 600 µl sulandırılmış proteinaz K (10 µl proteinaz K + 590 µl TE buffer) eklendi. Vortekslendi ve 10 dakika 25 °C'de bekletildi.

3. 10 dakika 14000 rpm'de santrifüje edildi. Süpernatant otoklavlanmış mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

4. Üzerine 450 µl etanol (%96-100) eklendi ve pipet ile karıştırıldı.

5. GeneJET purifikasyon kolonu toplama tüpünün içine yerleştirildi ve purifikasyon kolonuna 700 µl lizat eklendi. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüje edildi. Süzülen toplama tüpündeki sıvı döküldü. Geri kalan süpernatant için aynı işlem tekrarlandı. Toplama tüpü atıldıktan sonra purifikasyon kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

6. Purifikasyon kolonuna 700 µl yıkama tamponu 1 eklendi ve 1 dakika 14000 rpm'de santrifüje edildi. Toplama tüpündeki süzüntü atıldı ve tekrar purifikasyon kolonu toplama tüpünün içine yerleştirildi.

7. Purifikasyon kolonuna 600 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 1 dakika 14000 rpm'de santrifüje edildi. Toplama kolonundaki süzüntü atıldı ve tekrar purifikasyon kolonu toplama tüpünün içine yerleştirildi.

8. Purifikasyon kolonuna 250 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 2 dakika 14000 rpm'de santrifüje edildi. Toplama tüpü atıldı. Purifikasyon kolonu 1,5 ml'lik RNaz-içermeyen mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

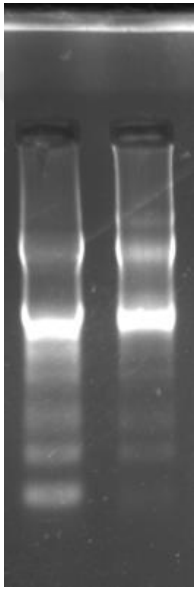
9. RNA ayırtırmak için 100 µl nükleaz free su Purifikasyon kolonunun merkezine döküldü ve 14000 rpm'de santrifüje edildi.

10. Purifikasyon kolonu atıldı ve RNA daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

Ekstrakte edilmiş RNA'dan 5 µl alınarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalında NanoDrop cihazında (Thermo NanoDrop 2000) örneklerin ölçümleri yapıldı. Alınan değerler ekstraksiyon kitinin çalıştığını gösterdi. Ayrıca, RNA örneklerinin kalitesi ölçüldü. NanoDropta ölçülen A260/A280

değerleri 1,91-2,05 değerleri arasında ölçüldü. Bu sonuçların kabul edilebilir değerler (1,8-2,1) içerisinde olduğu tespit edildi.

cDNA sentez kitinin önerdiği protokole göre cDNA öncesi RNA doğruluğu ölçüldü. Bunun için elektroforez (Hoefer Scientific Instruments) kullanıldı. 18S ve 28S rRNA bantları görüldü (Şekil 2.1). 28S bandı 18S bandının 2 katı kadar daha parlaktır. Bu sonuçlar RNA ekstraksiyonun yapıldığını göstermektedir.



Şekil 2.1. Elektroforezde 18S ve 28S Bandında RNA'nın Görüntülenmesi.

cDNA Sentezi

RNA ekstraksiyonundan elde edilen Total RNA'lar NanoDrop cihazında miktarları ölçüldü. RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Çizelge 2.8) ile yapıldı. Kitin çalışması kontrol edildi.

Çizelge 2.8. Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit içeriği.

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	100 reaksiyonluk
RevertAid RT (200 U/ μ L)	120 μ L

RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	120 μ L
5X Reaction Buffer 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	500 μ L
10 mM dNTP Mix	250 μ L
Oligo(dT)18 Primer, 100 μ M	120 μ L
Random Hexamer Primer, 100 μ M,	120 μ L
Forward GAPDH Primer, 10 μ M	20 μ L
Reverse GAPDH Primer, 10 μ M	20 μ L
Control GAPDH RNA, 0,05 μ g/ μ L	20 μ L
Water, nuclease-free	2 x 1.25 μ L

Kontrol reaksiyonları:

1. Reverse transcriptase enzimi olmayan negatif kontrol (RT-): RT-PCR’da RNA örneğinin genomik DNA kontaminasyonunun değerlendirilmesinde kullanılır.
2. Template RNA olmayan negatif kontrol (NTC): Bileşenlerin kontaminasyonunu kontrol etmek için kullanılır.

Negatif Kontrolün Hazırlanması:

Çözünmeden sonra kısa bir süre kitin tüm bileşenleri santrifüje edildi. Buzun üzerine yerleştirildi.

- a. Buz üzerinde Çizelge 2.9’da belirtilen bileşenler nükleaz free bir tüpe eklendi.

Çizelge 2.9. cDNA Sentezi İçin Gereken Bileşenler.

Bileşen	RT-	NTC	
Template RNA	Total RNA	-	1 μ L (200ng/ μ L)
Primer	Random Hexamer primer	Random Hexamer primer	1 μ L
Water, nuclease-free to			12 μ L
Total volume			12 μ L

- b. 65 °C’de 5 dakika tutuldu.
- c. Aşağıdaki bileşenler sırasıyla eklendi (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.10. cDNA Sentezi İçin Gereken Bileşenler.

RT-	NTC	Miktar
5X Reaction Buffer	5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	10 mM dNTP Mix	2 µL
-	RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Total volume		20 µL

- d. Yavaşça karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüje edildi.
- e. Termal cyler’da 25 °C’de 5 dakikanın ardından 42 °C’de 60 dakika inkube edildi. 70 °C’de 5 dakika reaksiyon sonlandırıldı.

3. Pozitif kontrol: Kit içeriğinde RNA örneği ve gene spesifik primerler bulunmaktadır. İnsan GAPDH kontrol RNA (1.3kb) in vitro transkripsiyon ile üretilmiştir. GAPDH-spesifik kontrol PCR primer insan fare ve rat GAPDH genlerine tamamlayıcı olarak dizayn edilmiştir ve 496 bp RT-PCR ürünü meydana getirir (Şekil 2.2).

Pozitif kontrol RT-PCR için protokol aşağıda anlatıldı.

- a. Buz üzerinde tüm bileşenleri çözdürdükten sonra vorteks ve kısa bir süre santrifüje edildi. Çizelge 2.11’de belirtilen bileşenler miktarlarda nükleaz içermeyen steril bir tüpe eklendi.

Çizelge 2.11. Pozitif Kontrol İçin Gerekli Bileşenler.

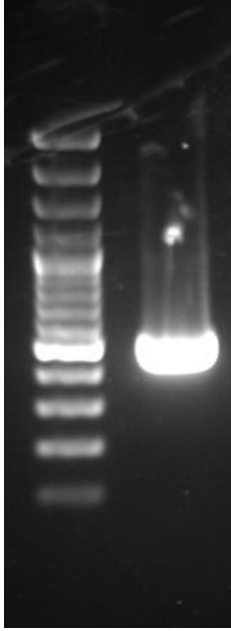
Bileşenler	Miktar
Control GAPDH RNA (50 ng/µL)	2 µL
Random Hexamer primer	1 µL

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid RT (200 U/µL)	1 µL
Water, nuclease-free	9 µL
Total volume	20 µL

b. Karıştırıldı ve santrifüje edildi.

c. 5 dakika 25 °C’de ardından 42 °C’de 60 dakika bekletildi. 70 °C’de ısıtılarak 5 dakika reaksiyon sonlandırıldı.

d. Hafifçe santrifüje edildi ve kontrol PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 2.2. cDNA Sentezinde Pozitif Kontrol Çalışmasında PCR Ürünün 496 bp’de Görüntülenmesi.

3 kontrol reaksiyonlarının sonuçlarına göre kitin çalıştığı doğrulandı.

RNA örneklerinden cDNA sentezi

Protokol:

1. RNA örnekleri hafifçe santrifüje edildi.
2. Buz üzerinde Çizelge 2.12’de belirtilen bileşenler nükleaz içermeyen bir tüpe eklendi.

Çizelge 2.12. cDNA Sentezi Protokolunda Gereken Bileşenler.

Template RNA	Total RNA	1 µL (1µg/ µL)
Primer	Random Hexamer primer	1 µL
Water, nuclease-free		10 µL
Total volume		12 µL

3. 65 °C’de 5 dakika tutuldu.
- c. Aşağıdaki bileşenler sırasıyla eklendi (Çizelge 2.13) .

Çizelge 2.13. cDNA sentez Protokolünde Gerekli Bileşinler.

5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Total volume	20 µL

- d. Yavaşça karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüje edildi.
- e. Termal cyclarda 25 °C’de 5 dakikanın ardından 42 °C’de 60 dakika ve 70 °C’de 5 dakika reaksiyon sonlandırıldı.

cDNA sentezinden hemen sonra numuların okumasına geçildi.

Numunelerin okunması:

Her bir numune için aşağıdaki Çizelgede belirtilen miktarda bileşenler (Çizelge 2.14.) QIAGEN Rotor-Gene P cihazında kullanılan tüplere konuldu. Pozitif

kontrol olarak standart 4, 5, 6 ve 7 konsantrasyonları ve 2 adet negatif kontrol kullanıldı.

Çizelge 2.14. RT-PCR Protokolü İçin Gerekli Bileşenlerin Miktarları

	Numune	Negatif kontrol	Pozitif kontrol
Mix	12,5 ul	12,5 ul	12,5 ul
Numune	5 ul	-	-
Kontrol	-	-	5 ul
FRW	0,8 ul	0,8 ul	0,8 ul
RVR	0,8 ul	0,8 ul	0,8 ul
PROBE	0,4 ul	0,4 ul	0,4 ul
NİS	5,5 ul	10,5 ul	5,5 ul
Toplam	25 ul	25 ul	25 ul

Pipetler küçük miktarlar için kullanıldığında hata payının yüksek olmasından dolayı, standartların dışındaki diğer maddeler ayrı bir tüpte toplanmış ve gödelere 20'şer µl paylaştırıldı.

Cihaz programı: 50 °C'de 2 dakika; bir kez 95 °C'de 10 dakika ve 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C'de 1 dakika 40 siklus yapıldı (Beltramo ve ark., 2006). Örnek analizleri doğrulanan kitler ile yapıldı.

QIAGEN Rotor-Gene P Real-Time PCR Sistem'de gerçekleşen reaksiyonların ardından her reaksiyon için eşik değeri otomatik olarak tespit edildi. Reaksiyon başında girilen standart eğri verilerine göre program tarafından reaksiyon sonunda örneklerin içerdiği DNA miktarı hesaplandı.

İstatistiki Hesaplamalar

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce normallik yönünden parametrik test varsayımlarından Shapiro Wilk ile varyansların

homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistik analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. İstatistiki hesaplamalarda SPSS 14.01 paket programından yararlanıldı.



3. BULGULAR

3.1. Morfometrik Parametreler

Vücut ağırlığındaki artış en çoktan aza doğru sırasıyla Grup 1, Grup 4, Grup 2 ve Grup 3 şeklinde bulundu (Çizelge 3.1). Bütün gruplar arasındaki vücut ağırlık artışındaki değişim anlamlı ($p<0,001$) bulundu. Gruplar arasında relatif karaciğer ağırlıkları bakımından önemli bir fark gözlenmedi ($p>0,001$).

Çizelge 3.1. Gruplara Göre Sıçanların Vücut Ağırlık Artışı ve Relatif Karaciğer Ağırlıkları.

Parametreler	Grup 1 (n:7)	Grup 2 (n:9)	Grup 3 (n:9)	Grup 4 (n:7)
Başlangıç ağırlıkları (g)	192,14 ± 31,38	195,77 ± 21,46	179,33 ± 19,95	175,71 ± 13,53
Son Ağırlıkları (g)	233,71 ± 28,48	217,00 ± 19,30	193,11 ± 19,74	205,71 ± 19,77
Ağırlık Değişimi (g)	41,57 ± 2,82 ^a	21,22 ± 2,17 ^c	13,77 ± 1,49 ^d	30,00 ± 2,71 ^b
Karaciğer Ağırlığı (g)	10,61 ± 1,20	11,33 ± 1,32	9,85 ± 1,87	9,91 ± 1,09
Relatif Karaciğer Ağırlığı	0,0454 ± 0,002	0,0521 ± 0,003	0,051 ± 0,011	0,048 ± 0,003

Değerler ortalama ± standart hatayı ifade eder. (a,b,c,d) aynı satırda gruplar arasındaki farklılıkları gösterir, $p<0,001$.

3.2. Klinik Bulgular

Çalışma sırasında 6 sıçan öldü. Bunlardan 4'ü kalpten kan alma sırasında verilen hasardan kaynaklı ölüm meydana geldi. Diğer 2 sıçanda nekropsi yapıldı. Aspirasyon pnömonisi bulguları gözlemlendi. Ölümün manipülasyon hatasından kaynaklandığı anlaşıldı.

Grup 1 ve Grup 4'te herhangi bir klinik bulgu gözlenmedi. Sipermetrin uygulanan gruplarda kilo artışında azalma ilk günlerde daha net görüldü. Ancak ilerleyen günlerde kademeli olarak ağırlık artışları normale yaklaştı. Bu durum hayvanların uygulamaya adaptasyonuna bağlandı. Sipermetrin verilen gruplarda, verilmeyi takiben 1-2 saat sonra hipersalivasyon, sırtın kambur tutulması, bacaklar ayırık yürüyüş, kaşınma, ataksi, konvulziyon ve aşırı duyarlılık ve arka bacak (siyatik

sinir) paralizi gözlemlendi. 4-5 saat sonra sıçanlar normale dönmeye başladı. Bazı sıçanlarda siyatik sinir paralizi daha uzun devam etti. Klinik bulguların görüldüğü sürede hayvanlar yem tüketmedi.

3.3. Oksidatif Stres

Sipermetrin ve JWH-133'ün karaciğerde oksidatif stres enzimlerine olan etkileri Çizelge 3.2'te özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Sipermetrin ve JWH-133 Ligandı Verilen Sıçanların Karaciğer Dokusundaki Oksidatif Stres Parametreleri.

	NK Grubu (n:6)	Grup 1 (n:7)	Grup 2 (n:7)	Grup 3 (n:7)	Grup 4 (n:7)
SOD*	80,01±5,35 ^b	84,03± 7,68 ^b	75,96± 1,31 ^b	51,77± 3,46 ^a	56,69± 5,53 ^a
MDA**	81,80±5,07 ^{ab}	77,35± 6,93 ^{ab}	86,42±7,21 ^b	81,69±6,67 ^{ab}	61,43± 8,39 ^a
GPx***	71,84±5,33 ^a	75,10±1,26 ^a	50,07±7,68 ^b	60,44±4,59 ^{ab}	50,45±3,21 ^b
SOD/GPx	1,13± 0,09 ^b	1,12±0,10 ^b	1,75±0,26 ^a	0,89±0,10 ^b	1,13±0,10 ^b

Değerler ortalama ± standart hatayı ifade eder. (a,b,c) aynı satırda gruplar arasındaki farklılıkları gösterir, $p<0,05$

SOD*: Süperoksit Dismutaz (U/g protein), MDA**: Malondialdehit ($\mu\text{M/g}$ protein), GPx***: Glutasyon peroksidaz (U/g protein).

Sadece sipermetrin verilen grupta (Grup 2) karaciğer dokusunda SOD ($p>0,05$) ve GPx ($p<0,05$) aktivitesinde azalma ve MDA ($p>0,05$) miktarında artma meydana geldi. Grup 3, Grup 2'ye göre kıyaslandığında SOD ($p<0,05$) aktivitesinde düşme, GPx ($p>0,05$) aktivitesinde hafif artma ve MDA miktarında ($p>0,05$) düşme meydana geldi. Grup 4'te MDA miktarında, SOD ve GPx aktivitesinde önemli derecede ($p<0,05$) düşme meydana geldi. SOD/GPx aktivite oranı Grup 2'de diğer gruplara göre önemli derecede ($p<0,05$) artış gösterdi.

JWH-133 verilen gruplarda kontrol grubuyla (Grup 1) karşılaştırıldığında SOD ve GPx aktivitelerinde önemli düşmeler görüldü. Aynı zamanda MDA miktarında da düşme meydana geldi.

3.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

Karaciğer fonksiyon test sonuçları Çizelge 3.3'te verildi.

Çizelge 3.3. Serumda Karaciğer Enzim Aktiviteleri ve Glukoz Miktarı.

	NK Grubu (n:6)	Grup 1 (n:6)	Grup 2 (n:7)	Grup 3 (n:7)	Grup 4 (n:6)
ALP*	266,57±5,32 ^{ab}	280,40±31,50 ^a	269,14±18,94 ^{ab}	260,71±10,87 ^{ab}	222,33±19,15 ^b
AST**	129,57±12,88 ^b	131±5,48 ^b	149,42±8,41 ^{ab}	175,71±18,07 ^a	148,16±7,91 ^{ab}
ALT***	63,86±0,96 ^b	72,16± 4,61 ^b	88,42±3,60 ^a	88,85±1,97 ^a	83,00±5,02 ^a
LDH****	595,83±82,32 ^b	600,5±94,43 ^b	538,8±96,79 ^b	1528,83±92,34 ^a	530±77,52 ^b
Glukoz	-	168,42±5,77	163,71±6,48	165,85±5,59	175,42±4,54

Değerler Ortalama ± standart hatayı ifade eder.

(a,b) ALP ve AST için gruplar arasındaki gösterir, $p<0,05$.

(a,b) ALT ve LDH için gruplar arasındaki farkı gösterir, $p<0,001$.

One-way analysis of variance by Duncan test ile yapıldı. $P<0,05$, $P<0,001$

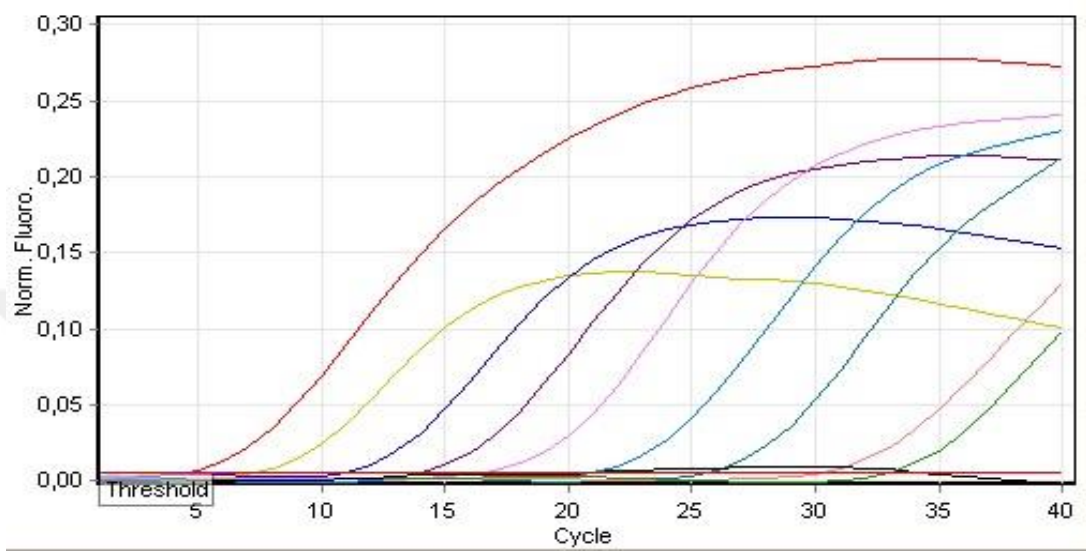
AST: Aspartat aminotransferaz (IU/L), *ALT: Alanin Aminotransferaz (IU/L), * ALP: Alkalen fosfataz (IU/L), ****LDH: Laktat dehidrojenaz (IU/L), Glukoz (mg/dL).

Negatif Kontrol Grubu ile genel kontrol (Grup 1) arasında herhangi bir fark bulunmadı. Genel kontrol (sadece taşıt verilen Grup 1) ile sipermetrin verilen Grup 2 karşılaştırıldığında serum ALP ($P>0,05$) ve LDH ($p>0,001$) düzeyinde düşme, serum AST ($p>0,05$) ve ALT ($P<0,001$) düzeyinde artma meydana geldi. Serum ALP seviyesi sadece JWH-133 verilen Grup 4'te genel kontrole göre önemli derece düştü ($p<0,05$). Serum AST seviyesi Sipermetrin + JWH-133 verilen Grup 3'te genel kontrole göre önemli miktarda arttı ($p<0,05$). Serum ALT değeride Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te kontrol grubuna göre anlamlı bir artış meydana geldi ($p<0,001$). Serum LDH aktivitesinde sadece anlamlı yükselme Grup 3'te meydana geldi ($p<0,05$). Glukoz değerinde gruplar arasında herhangi bir fark meydana gelmedi.

Karaciğer enzim parametrelerine göre JWH-133, sipermetrin ile oluşturulan karaciğer hasarını artırdığı değerlendirildi. JWH-133, sağlıklı ratlara verildiğinde ALT miktarını artırdı.

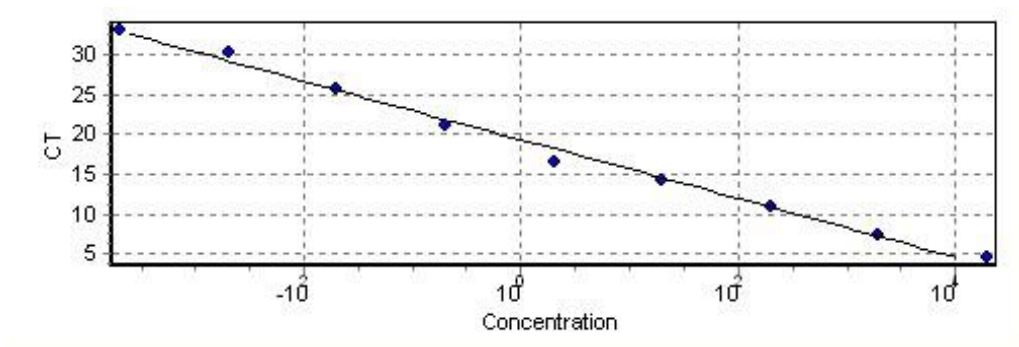
3.5. RT-PCR Analizleri

Kannabinoid reseptör 2 için pozitif kontrolden log 10'na göre 9 basamak sulandırılarak standart eğri çizdirildi. Örneklerin mRNA miktar ölçümünde kullanılmak üzere en uygun 4 adet standart sulandırması (std 4, 5, 6 ve 7) seçildi (Şekil 3.1.).



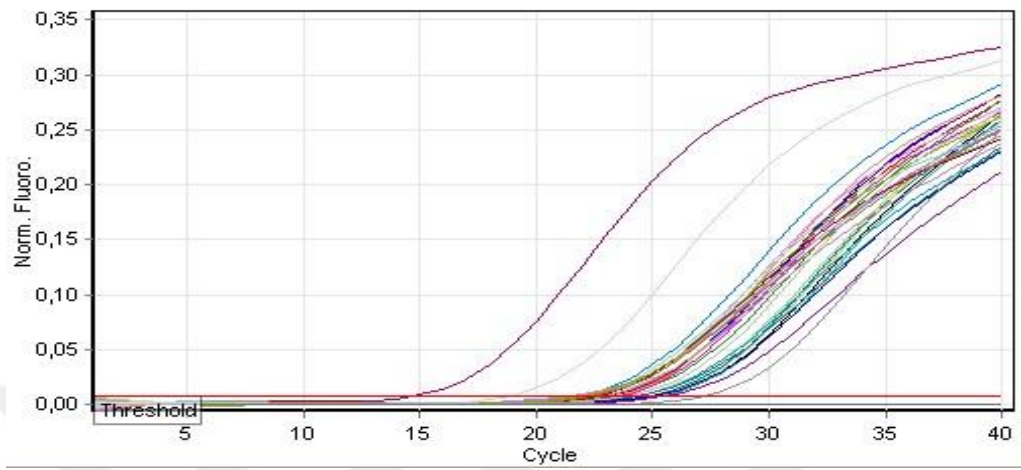
Şekil 3.1. Standart Eğrilerinin Oluşturulması Amacıyla Hazırlanan Sulandırmalara Ait Amplifikasyonlar.

Elde edilen sonuçlara göre standart eğri çizdirildi (Şekil 3.2).

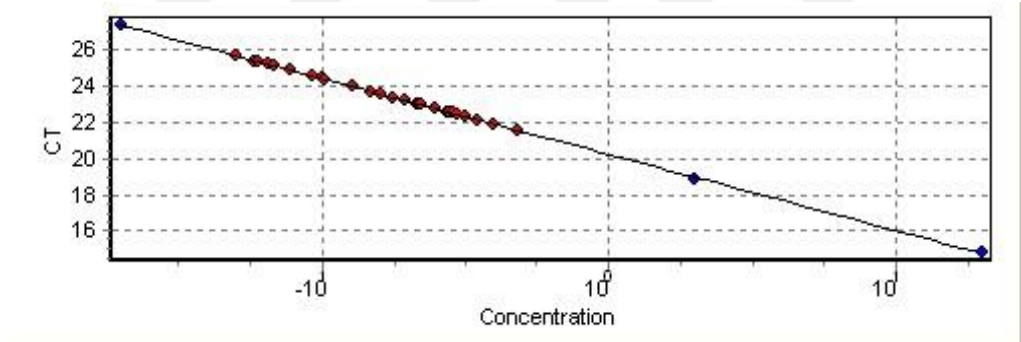


Şekil 3.2. CB2 RT-PCR için Standart Eğri Grafiği ($r^2:0,99988$).

Standart eğriye göre numunelerdeki mRNA miktarları tespit edildi (Şekil 3.3; Şekil 3.4)



Şekil 3.3. Uygulama Gruplarında Bulunan Sıçanların Karaciğer Dokusundaki CB2 mRNA Sonuçları



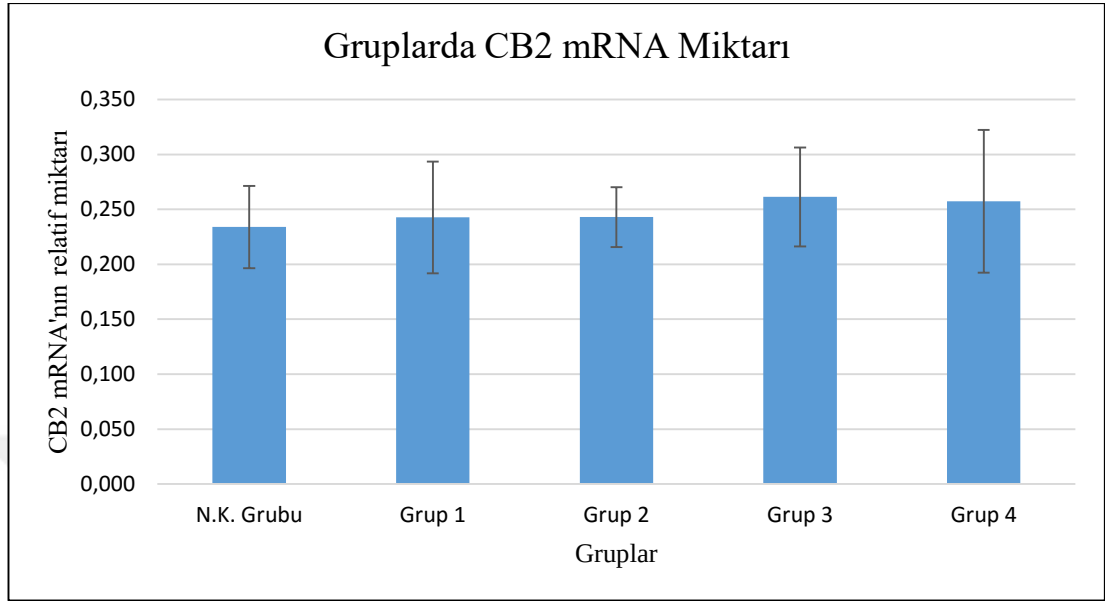
Şekil 3.4. Karaciğer Dokusunda CB2 mRNA Düzeylerinin Standart Eğri Üzerindeki Yerleşimi (r^2 : 0,99988).

Çalışmada 14 günün sonunda CB2 reseptörünün mRNA sentezi bakımından gruplar arasında fark bulunamadı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Gruplarda Bulunan CB2 mRNA Miktarı

	NK Grubu	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
n	5	6	6	6	6
mRNA düzeyi (pg/reaksiyon)	0,234±0,017	0,243±0,023	0,243±0,011	0,261±0,018	0,257±0,027

Değerler ortalama $\pm$ standart hatayı ifade eder.

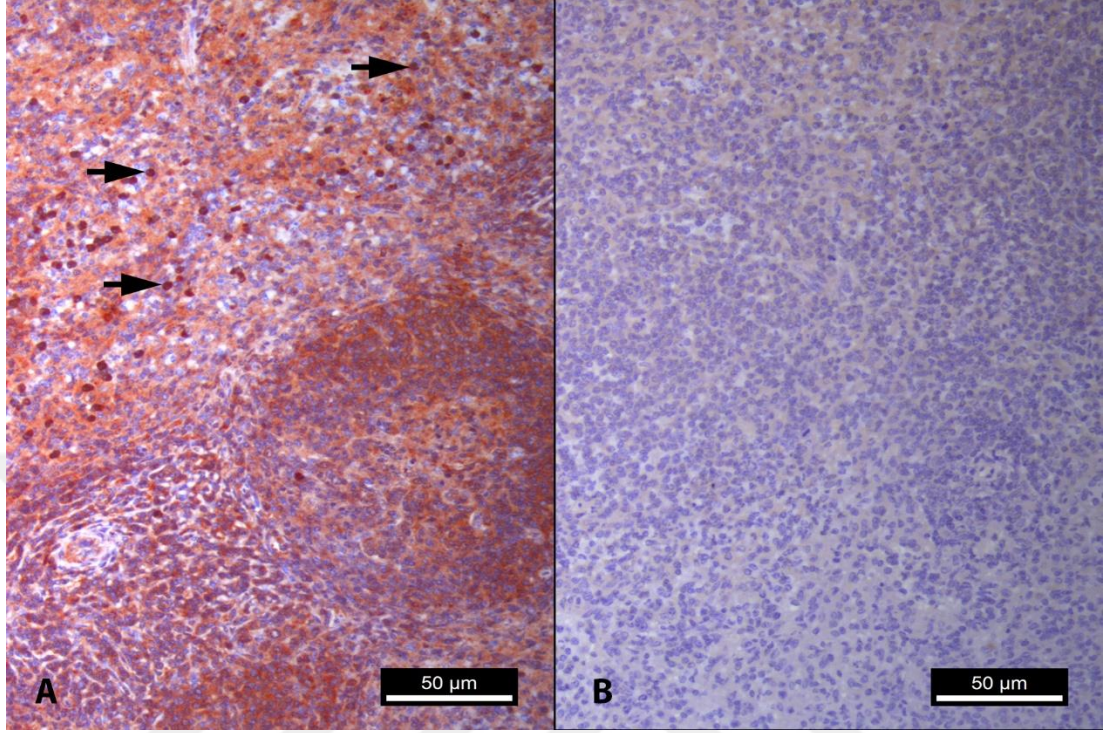


Grafik 3.1. Gruplarda CB2 mRNA Miktarları. CB2 karaciğerde ekprese edilir. Negatif Kontrol Grubu ve Grup 1'de amplifikasyon 23. siklustan sonra meydana geldi. Sipermetrin, sipermetrin+JWH-133 ve sadece JWH-133 verilen gruplarda CB2 mRNA seviyesinde istatistiksel olarak önemli artma meydana gelmedi. Veriler relatif mRNA miktarının ortalama $\pm$ standart sapması olarak hesaplandı.

Karaciğerde CB2'nin varlığı QRT-PCR kullanılarak doğrulandı. Karaciğer amplifikasyonu 23. siklustan sonra meydana geldi (Şekil 3.3). Gruplar arasında CB2 mRNA miktarı bakımından kıyaslandığında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Grafik 3.1) (Çizelge 3.4). Negatif kontrollerde herhangi bir amplifikasyon meydana gelmedi.

3.6. Immunohistokimyasal Bulgular

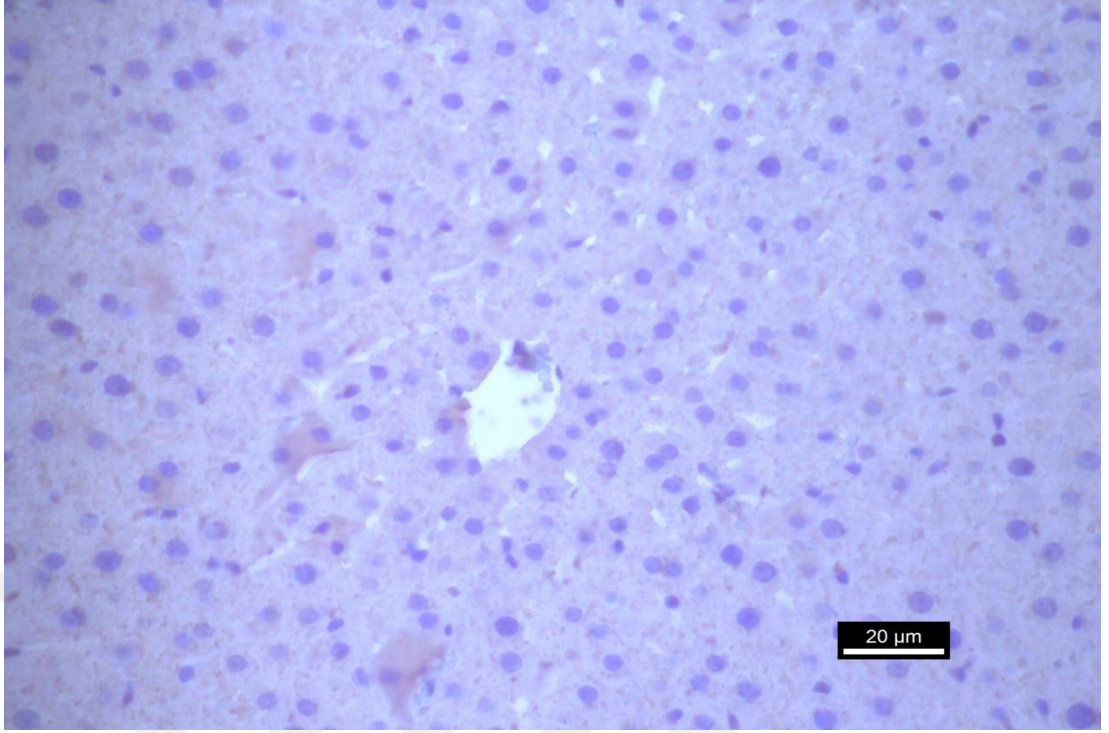
İmmün boyamada pozitif ve negatif kontrol olarak dalak kullanıldı. Pozitif kontrolde (dalakta) mononükleer lökositlerde güçlü immunpozitivite görüldü (Şekil 3.5A). Negatif kontrolde immunpozitiviteye rastlanmadı (Şekil 3.5B).



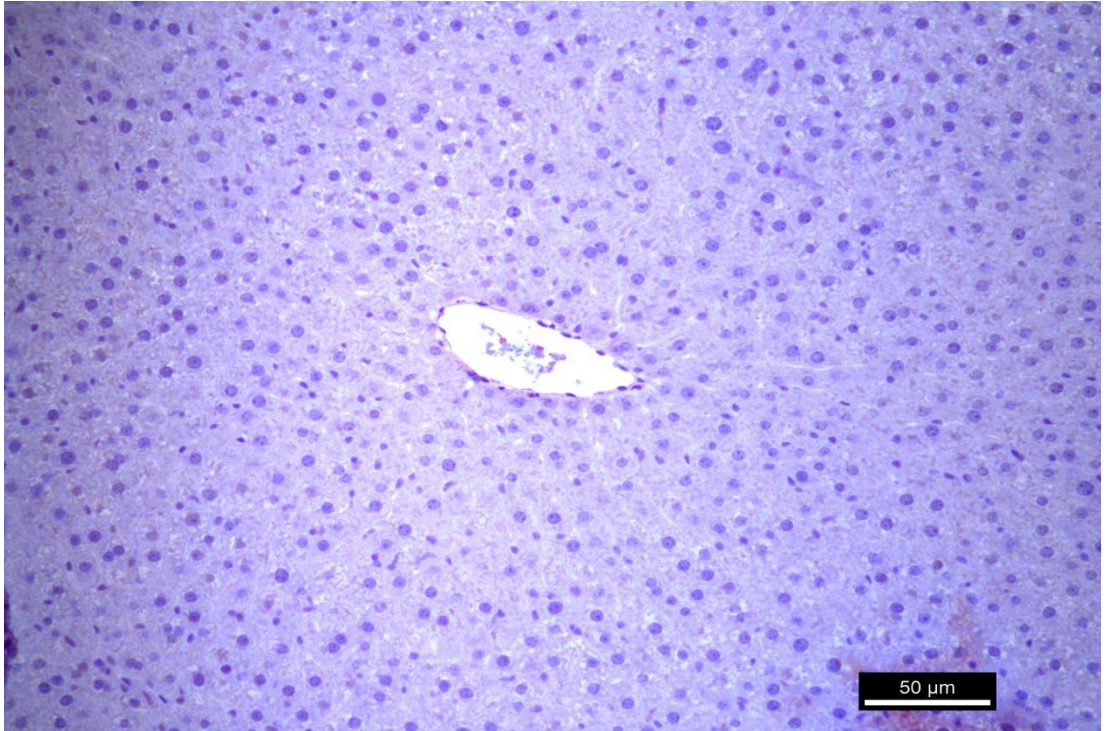
Şekil 3.5. Dalakta CB2 Reseptör Ekspresyonu İçin Pozitif ve Negatif Kontrol Boyaması. A: Pozitif kontrol, B. Negatif kontrol. İmmunopozitif mononükleer lökositler (ok).

Gruplar arasında CB2 reseptörü yönünden yapılan immun boyamalarda, karaciğerin V. centralis'i ve lobuli hepatis'ler arasında yerleşen trias hepatis (V. interlobularis, A. hepatica ve D. biliferus) yapıları değerlendirildi.

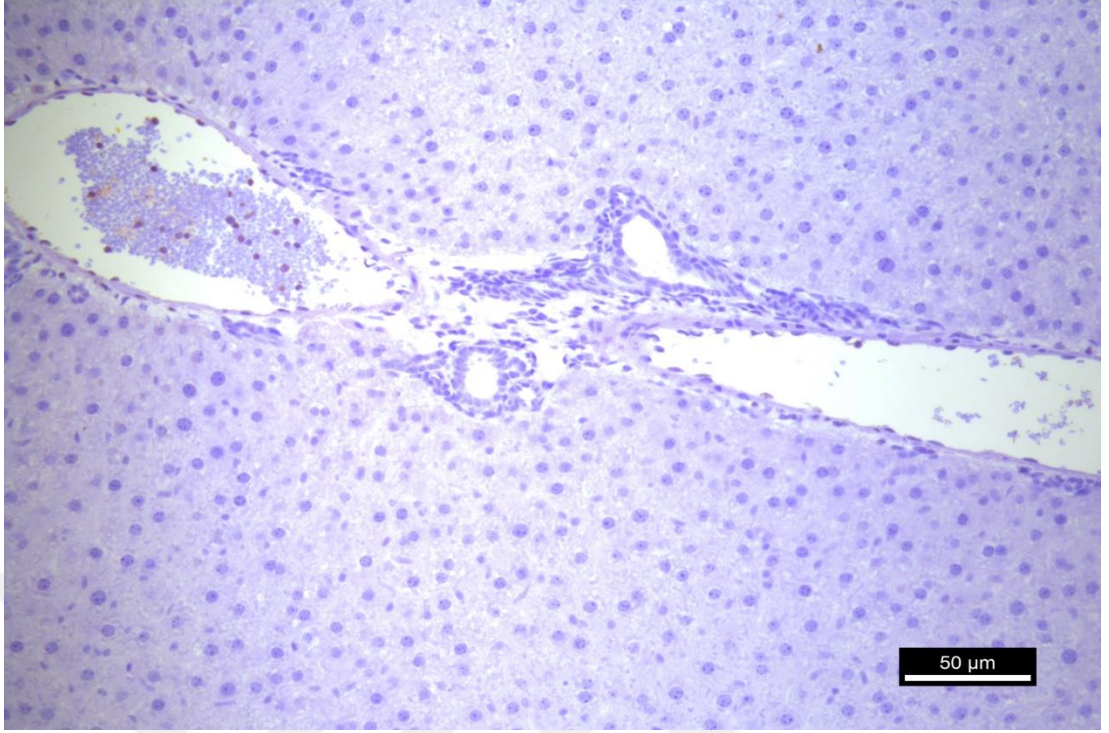
Negatif Kontrol Grubu ve Grup 1'den alınan karaciğerde CB2 reseptör ekspresyonu çok zayıf olarak gözlendi (Şekil 3.6; Şekil 3.7; Şekil 3.8). Her iki grupta da fibrosit/fibroblastlarda ve safra kanalı epitel hücrelerinde çok zayıf immun pozitiflik görüldü. Ancak, hepatosit, Kupffer ve mast hücrelerinde immun reaksiyona hiç rastlanmadı.



Şekil 3.6. Negatif Kontrol Grubundaki Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. centralis Çevresindeki Dağılımı.

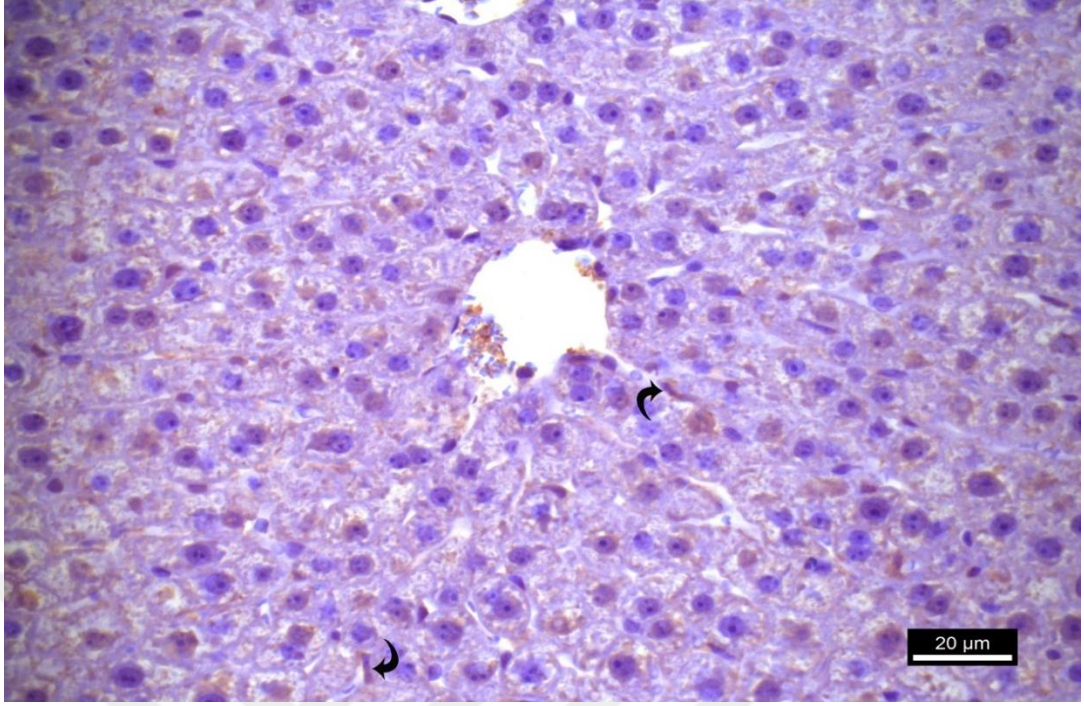


Şekil 3.7. Grup 1'de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. centralis Çevresindeki Dağılımı.

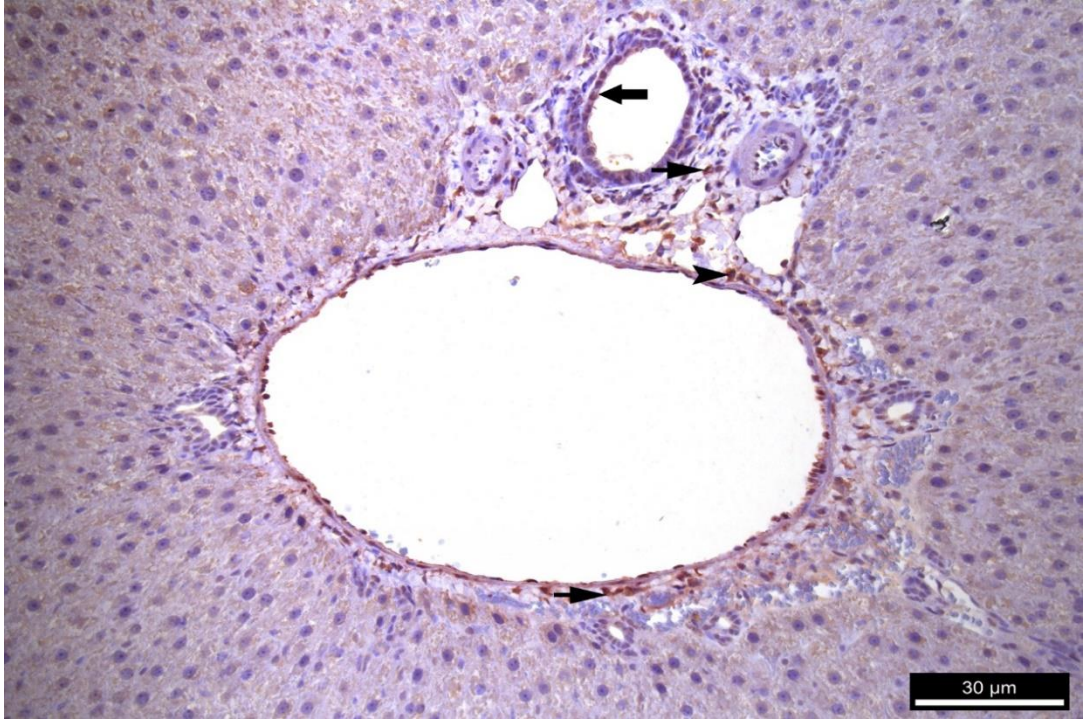


Şekil 3.8. Grup 1’de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun Trias Hepatis Çevresindeki Dağılımı.

Sipermetrin verilen Grup 2’de CB2 reseptör ekspresyonu Kupffer hücreleri (Şekil 3.9), fibroblastlar (Şekil 3.10), mast hücreleri (Şekil 3.10) ve safra kanalı epitelinde (Şekil 3.10) kuvvetli immunpozitivite (++++) görüldü. Yapılan incelemelerde özellikle Grup 2’de trias hepatis çevresindeki fibro septa alanında artış dikkat çekti.

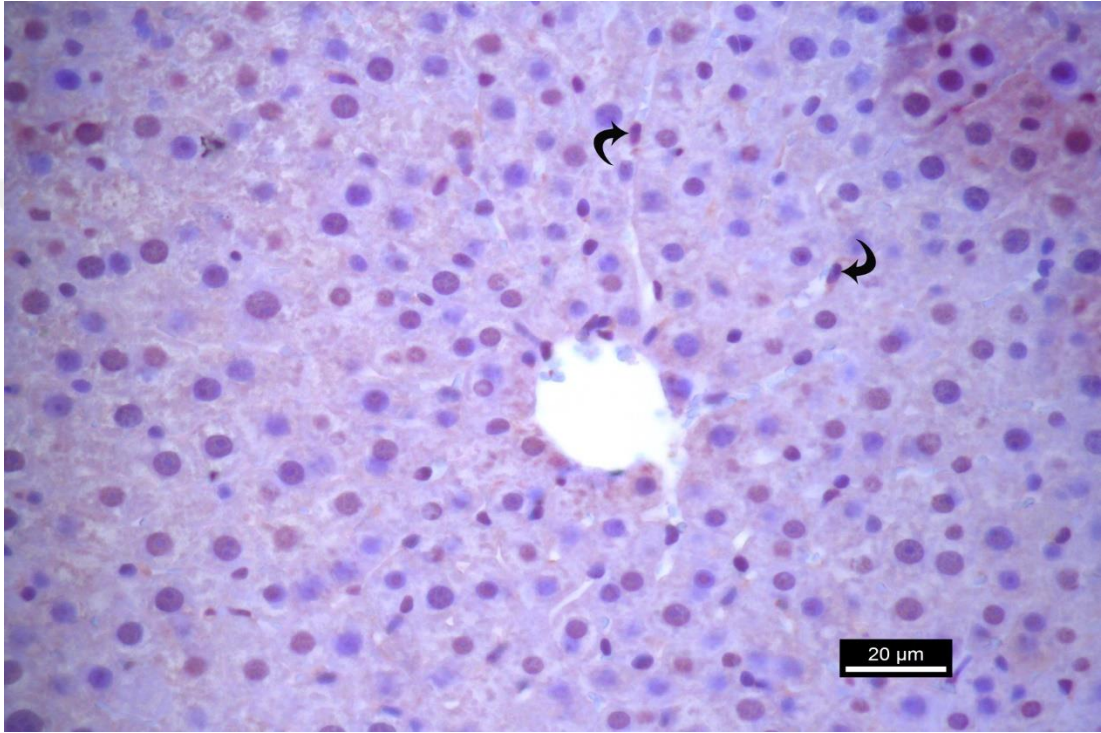


Şekil 3.9. Grup 2’de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun V. centralis Çevresindeki Dağılımı. Kupffer Hücresi (eğri ok).

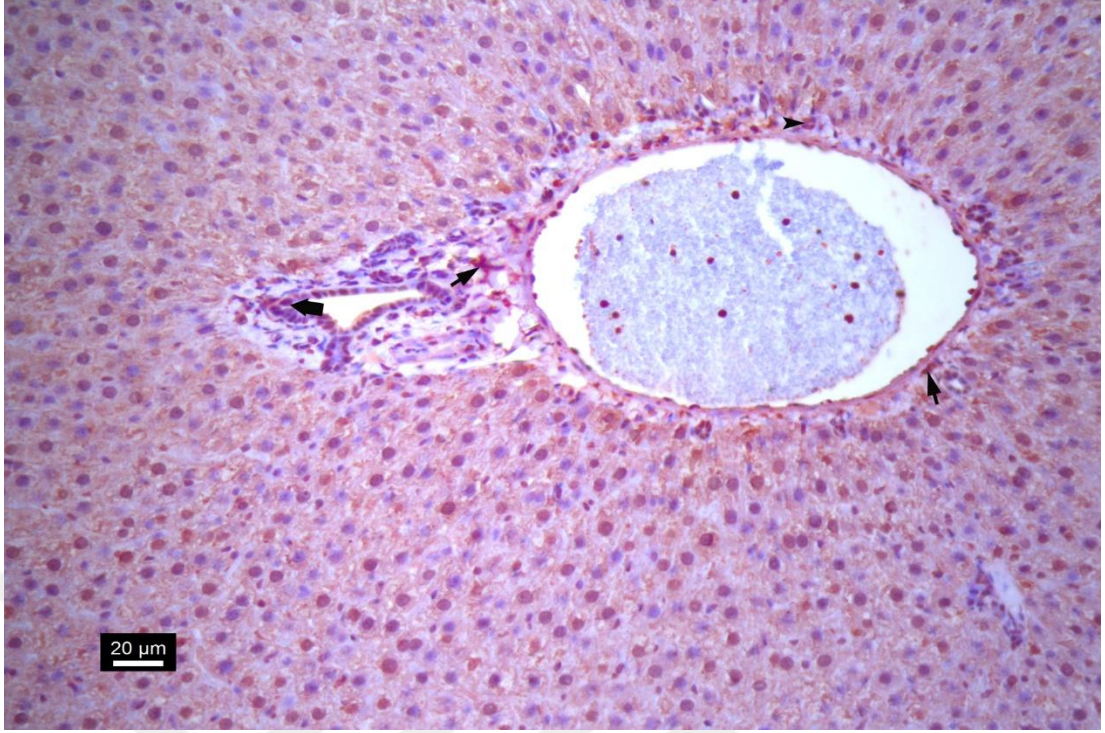


Şekil 3.10. Grup 2’de Sıçan Karaciğeri, CB2 Reseptör Ekspresyonun Trias Hepatis Çevresindeki Dağılımı. Safra kanalı epiteli (kalın ok). Fibrosit/fibroblast (ince ok). Mast hücresi (ok başı).

Sipermetrin + JWH-133 verilen Grup 3'te CB2 reseptör ekspresyonu Kupffer hücreleri (Şekil 3.11), fibroblastlar (Şekil 3.12), mast hücreleri (Şekil 3.12) ve safra kanalı epitelinde (Şekil 3.12) kuvvetli immunpozitivite (++++) görüldü. Yapılan incelemelerde Grup 3'te trias hepatitis çevresindeki fibro septa alanında artış dikkat çekti. CB2 ekspresyon miktarının belirlenmesi semikantitatif olarak yapılmış olup Grup 2 ve Grup 3 arasında önemli bir farklılık gözlenmedi.

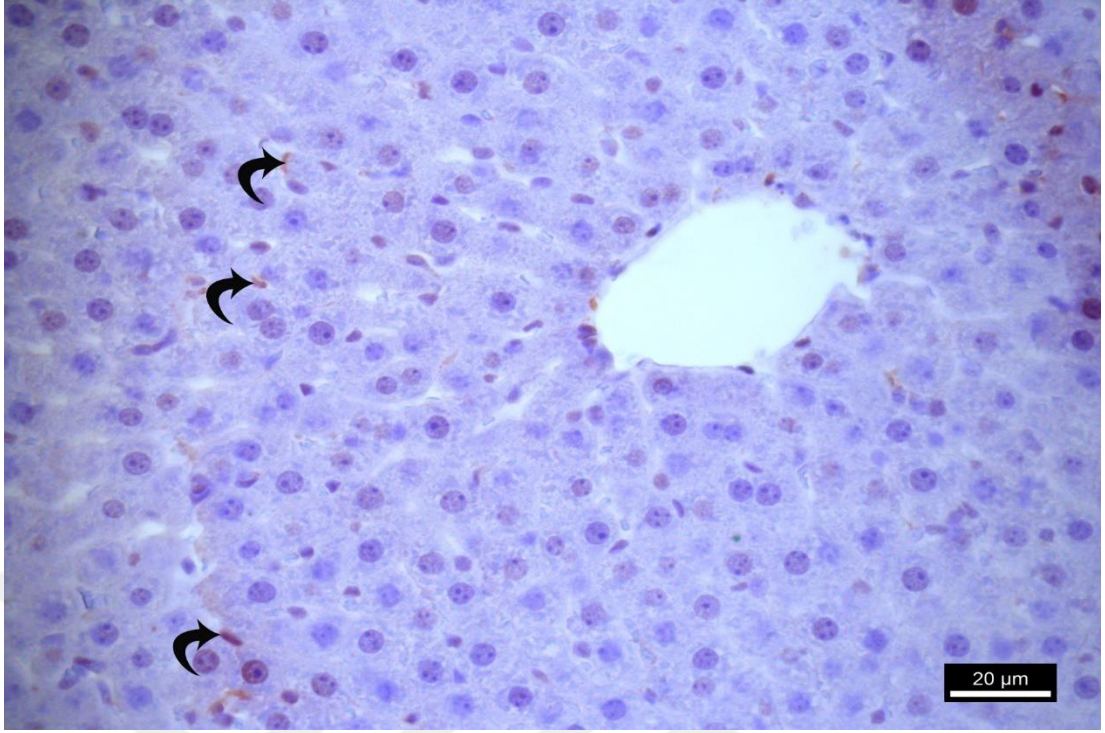


Şekil 3.11. Grup 3'te CB2 Reseptör Ekspresyonun V. centralis Çevresindeki Dağılımı. Kupffer Hücresi (eğri ok).

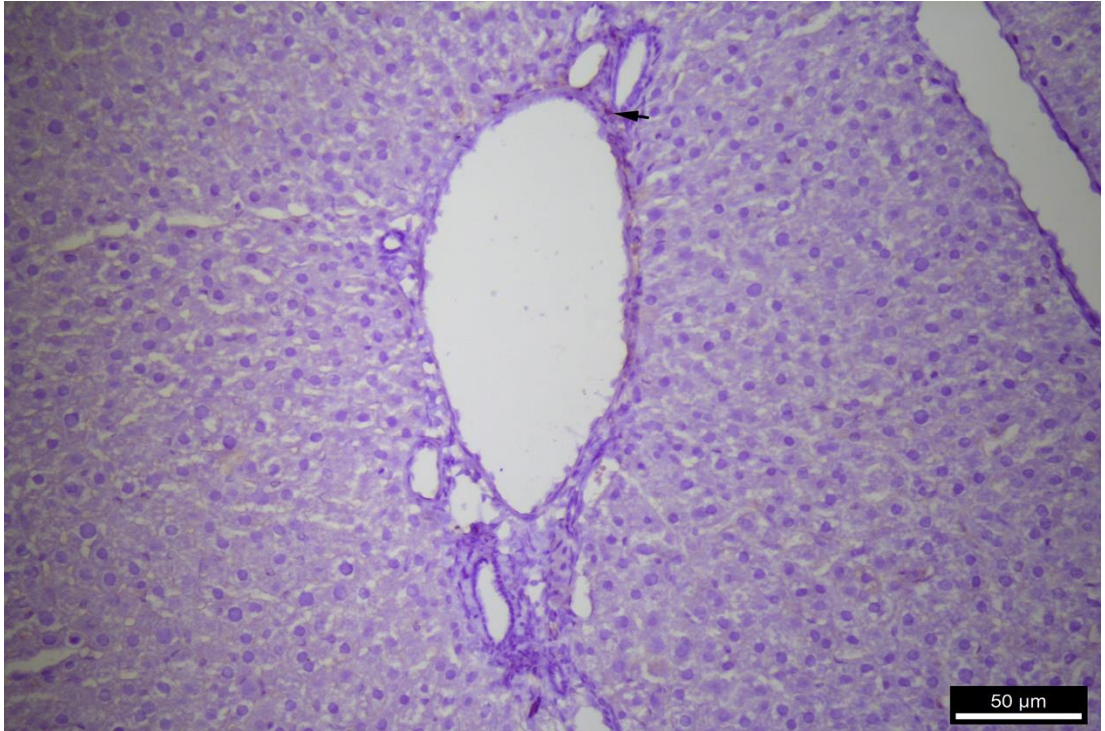


Şekil 3.12. Grup 3'te CB2 Reseptör Ekspresyonunun Trias Hepatis Bölgesindeki Dağılımı. Safra kanalı epiteli (kalın ok). Fibrosit/fibroblast (ince ok). Mast hücresi (ok başı).

Grup 4'te zayıf immunpozitiflik (++) Kupffer hücrelerinde (Şekil 3.13) ve fibrosit/fibroblastlarda (Şekil 3.14) gözlemlendi.

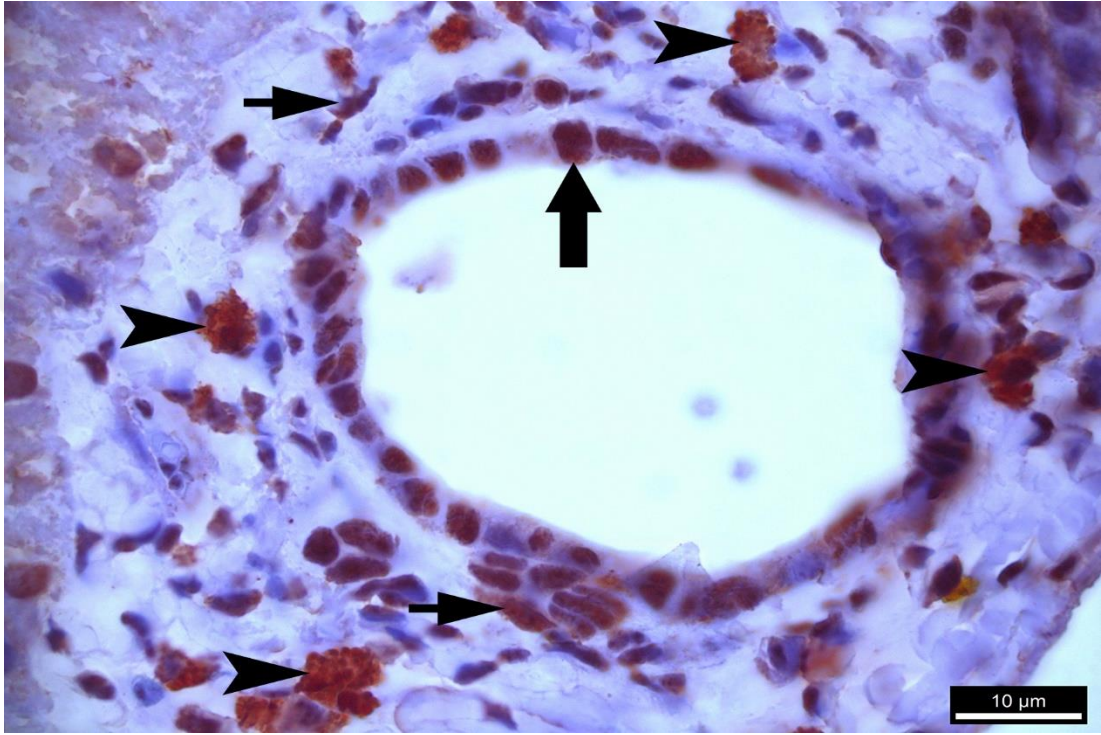


Şekil 3.13. Grup 4'ten CB2 Reseptör Ekspresyonunun V. Centralis Çevresindeki Dağılımı. Kupffer hücreleri (eğri ok). Sinuzoidlerde immun pozitif Kupffer hücrelerinin dağılımı.



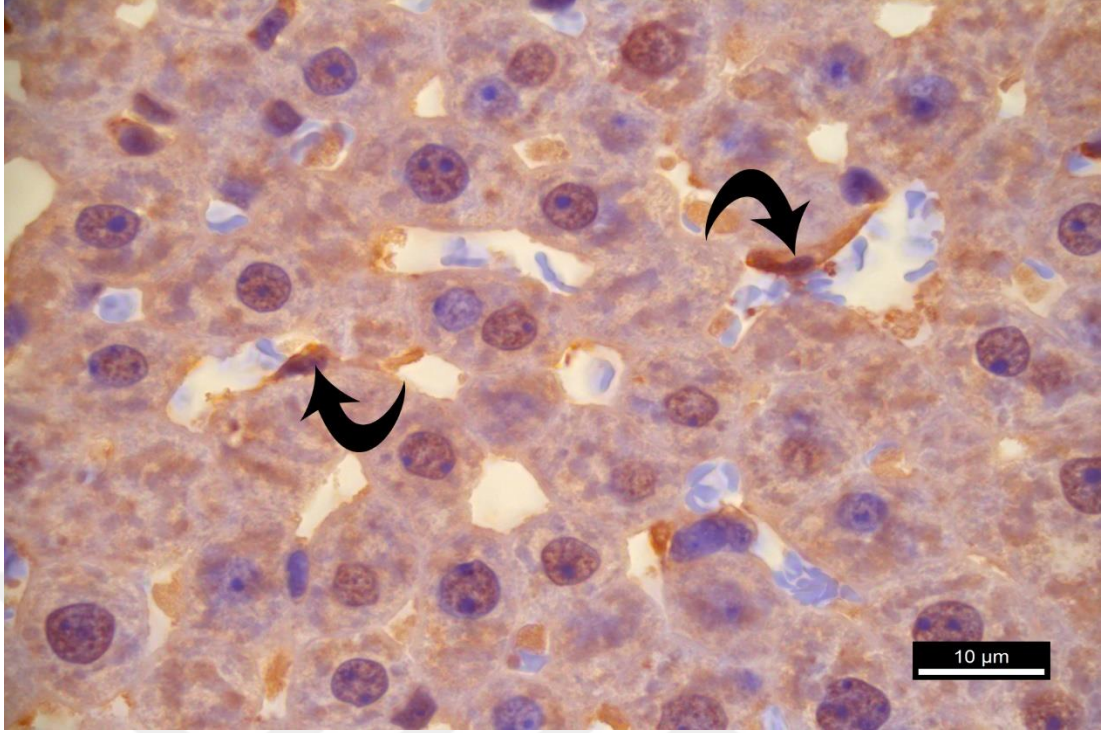
Şekil 3.14. Grup 4'te CB2 Reseptör Ekspresyonunun Trias Hepatis Çevresindeki Dağılımı. Fibrosit/fibroblast hücresi (ok).

Sipermetrin verilen gruptaki sıçanların karaciğerinde immun pozitif olan Fibrosit/fibroblastlar, safra kanalı epitel hücreleri, mast hücreleri Şekil 3.15'te 40'lık büyütmede gösterildi.



Şekil 3.15. Sipermetrin Uygulanan Sıçanlarda Hücresel İmmunreaksiyonların Gösterilmesi. Mast hücresi (ok başı), safra kanalı epitel hücresi (kalın ok), fibroblast hücresi (ince ok).

Sipermetrin verilen gruptaki sıçanların karaciğerinde immun pozitif olan Kupffer hücreleri Şekil 3.16'da 40'lık büyütmede gösterildi.



Şekil 3.16. Sipermetrin Uygulanan Sıçanlarda Hücresel İmmünreaksiyonların Gösterilmesi. Sinuzoid lümeninde Kupffer hücresi (eğri ok).

Karaciğerde eksprese edilen CB2 reseptörlerinin gruplarda hücresel düzeyde skorlanması Çizelge 3.5’da gösterildi.

Çizelge 3.5. Karaciğerde Eksprese Edilen CB2 Reseptör Dağılımının Hücresel Düzeyde Skorlanması

	NK Grubu	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Hepatosit	-	-	-	-	-
Fibroblast	+	+	++++	++++	++
Safra kanal epiteli	+	+	+++	+++	+
Kupffer hücresi	-	-	+++	+++	+
Mast hücresi	-	-	+++	+++	-

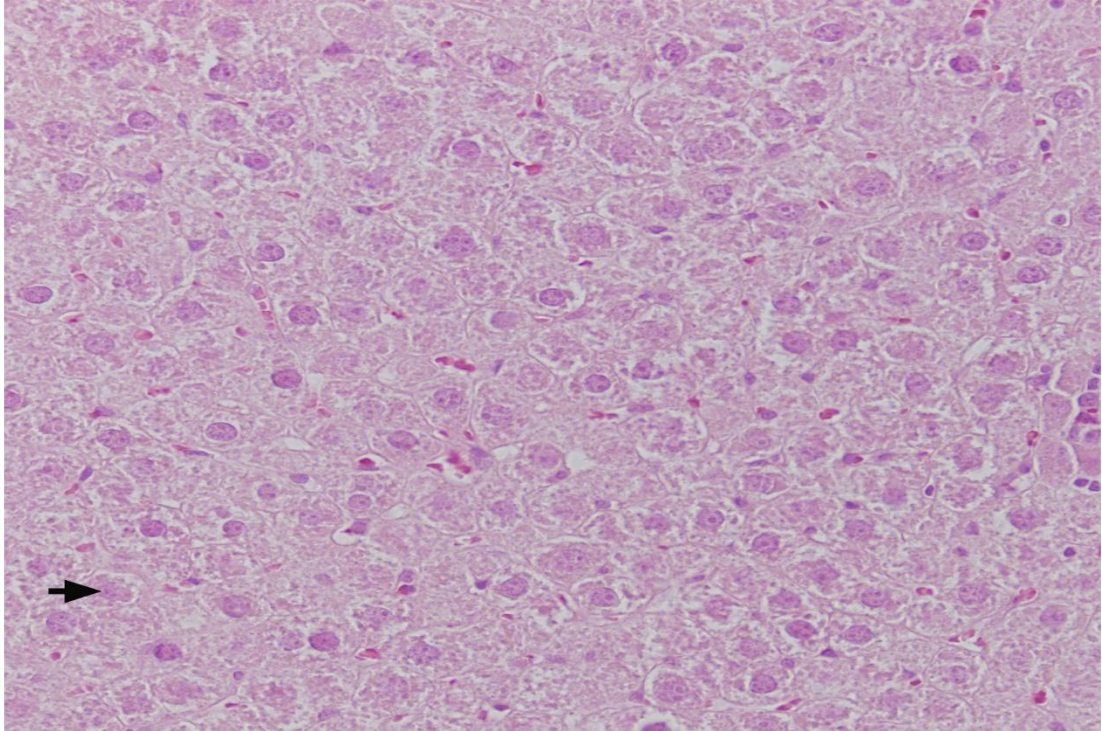
İmmunboyama yoğunluğunun semikantitatif skorlaması: -, negatif; + çok zayıf; ++, zayıf; +++, orta; +++++, kuvvetli.

Sonuç olarak immunohistokimyasal boyamalarda yapılan sübjektif değerlendirmelerde NK Grubunda (Şekil 3.6) ve Grup 1’de (Şekil 3.7) çok zayıf, Grup 4’te zayıf, Grup 2 ve Grup 3’te kuvvetli immunopozitivite gözlemlendi (Çizelge 3.5). Grup 2 ve 3’te CB2 reseptör ekspresyonu fibroblastlar, kupffer hücreleri, mast

hücreleri ve safra kanalı epitelinde arttığı gözlemlendi (Şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11). Grup 4'te zayıf bir şekilde fibroblastlarda artış gözlemlendi (Şekil 3.12).

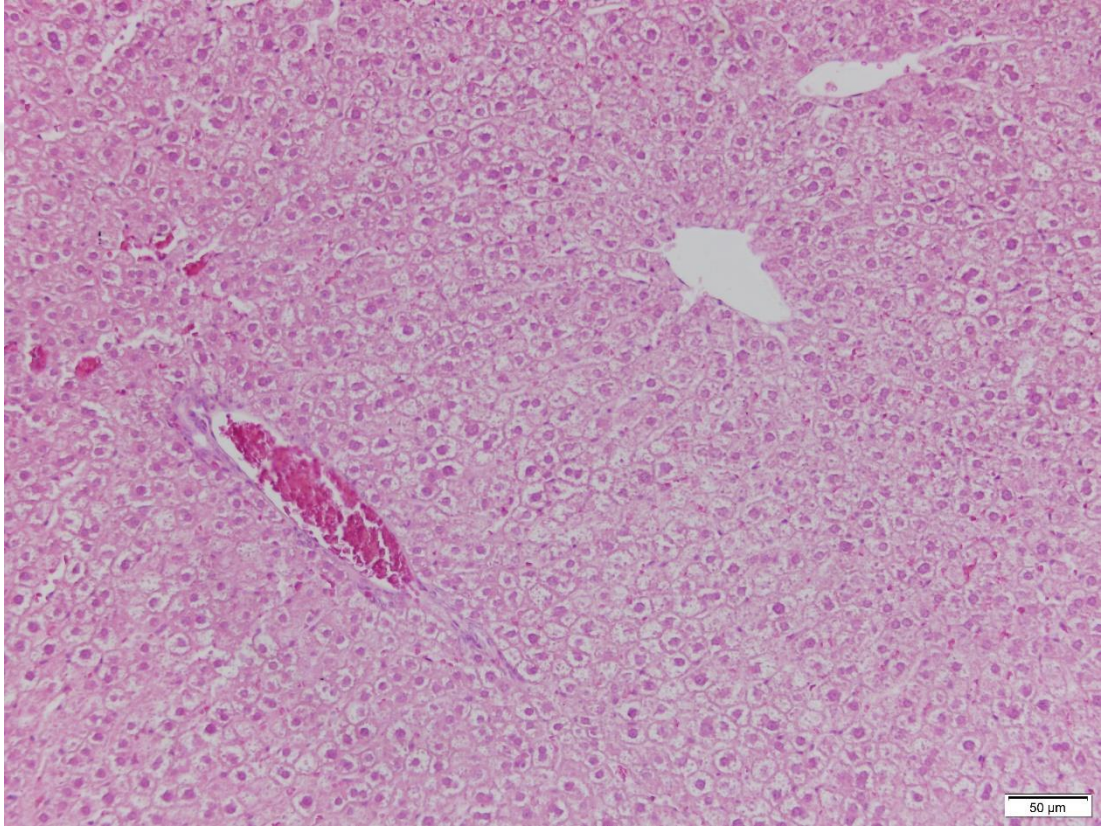
3.7. Histopatolojik Bulgular

Denemeler sonunda eter anestezi ile kurban edilgen toplam 32 sıçanın (Grup 1 7; Grup 2 9; Grup 3 9; Grup 4 7sıçan) karaciğeri histopatolojik olarak değerdendirildi. Grup 1'de hepatositlerde yer yer parenkim dejenerasyonu dikkati çekti (7/7). Bir hayvanda bazı hepatositlerin çekirdeklerinin tamamen kaybolduğı (Şekil 3.17, ok) ve tek tük dev çekirdekli hepatositler bulunduğı gözlemlendi. Bazı hepatositler çift çekirdeğe sahipti (3/7). Ayrıca bir hayvanda portal bölgede ve Remark kordonları arasında tek tük lenfosit ve histiyositlere rastlandı. Değerdendirmeye göre Grup 1 ve NK Grubundaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlemlendi.

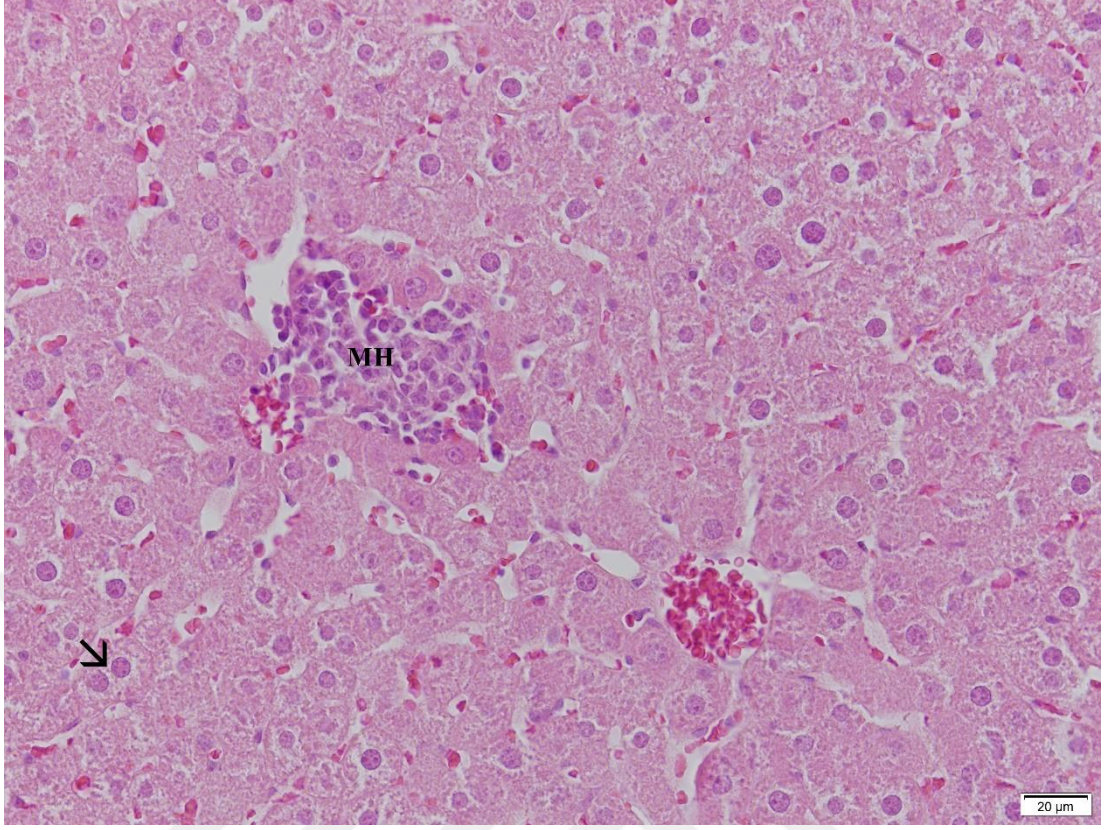


Şekil 3.17. Grup 1'den Alınan Sıçan Karaciğeri (ok-kaybolan çekirdek görüntüsü).

Sadece sipermetrin uygulanan Grup 2’de sıçanların histopatolojik incelemesinde (n:9) damarların hiperemik olduğu farkedildi. Hepatositlerde orta şiddette parenkim dejenerasyonundan nekroza varan değişiklikler dikkati çekti (Şekil 3.18) (9/9). Remark kordonları dissosiye görünüme sahipti ve yer yer Kupffer hücreleri sayıca artmıştı (4/9). Dev çekirdekli (2/9) ve çift çekirdekli hepatositlere rastlandı (Şekil 3.19-ok) (4/9). Bununla beraber 1 hayvanda fokal mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 3.19-MH).



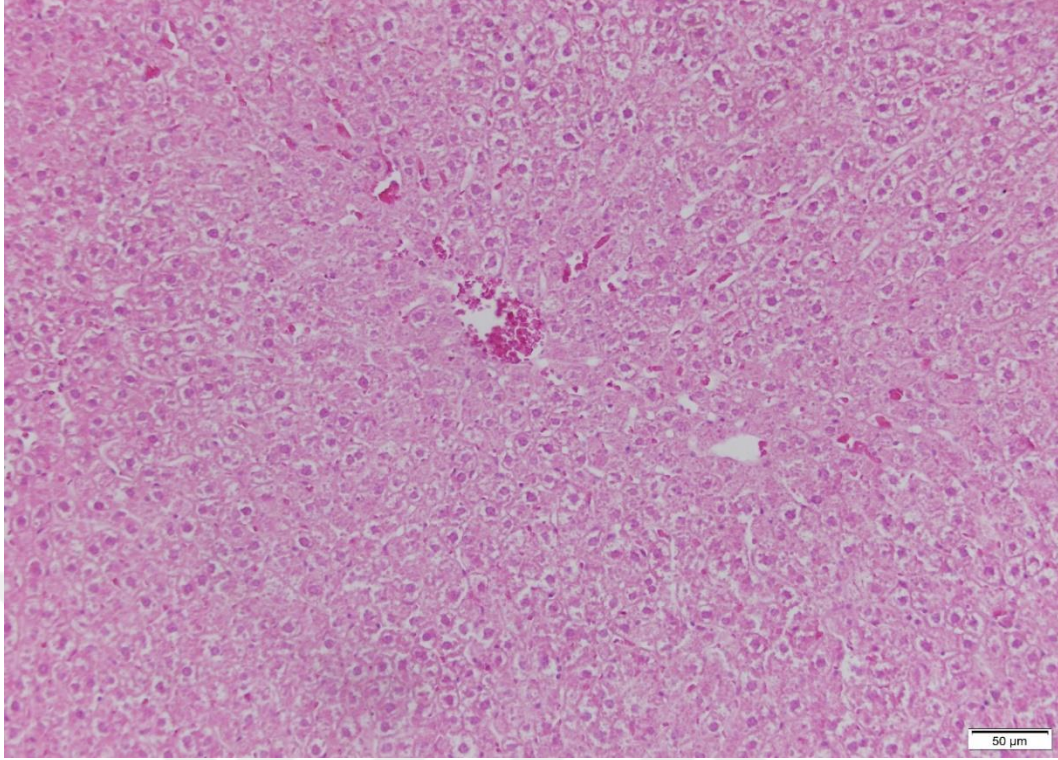
Şekil 3.18. Sadece Sipermetrin Uygulanan Sıçandan Alınan Karaciğer Görünümü. Orta şiddette (++) parankim dejenerasyonundan nekroza varan değişiklikler gözlemlendi.



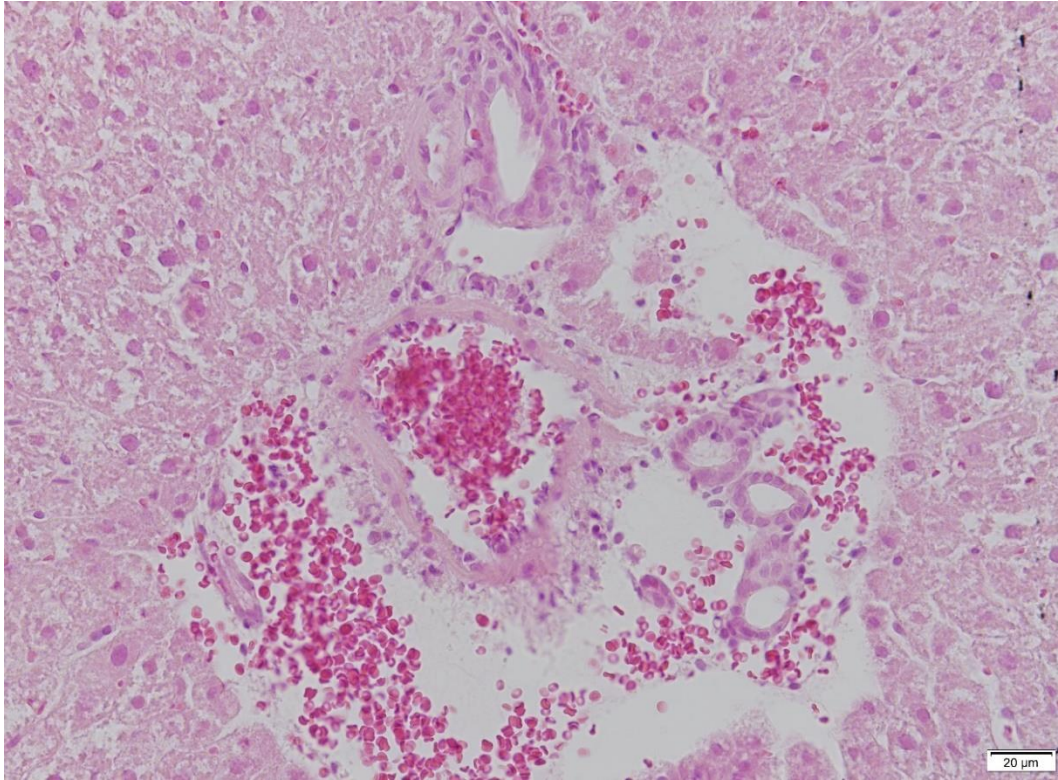
Şekil 3.19. Sadece Sipermetrin Uygulanan Sıçanın Karaciğer Görünümü. Ok- çift çekirdekli hepatosit, MH-mononükleer hücre infiltrasyonu.

Grup 2’de orta şiddette parankim dejenerasyonu (++) gözlemlendi.

Sipermetrin + JWH-133 verilen Grup 3’teki sıçanların histopatolojik değerlendirmesinde (n:9) damarlarda hiperemi, karaciğer epitel hücrelerinde çok şiddetli parenkim dejenerasyonu ve nekroz gözlemlendi (Şekil 3.20). Remark kordonları düzenini kaybettiği, Kupffer hücrelerinde sayıca artışın olduğu gözlemlendi (3/9). Çok sayıda dev çekirdekli (6/9) ve çift çekirdekli hepatositler (8/9) dikkati çekti. Ayrıca bir hayvanda portal bölgede serbest halde eritrositler ve safra kanalı hiperplazisi gözlemlendi (Şekil 3.21).

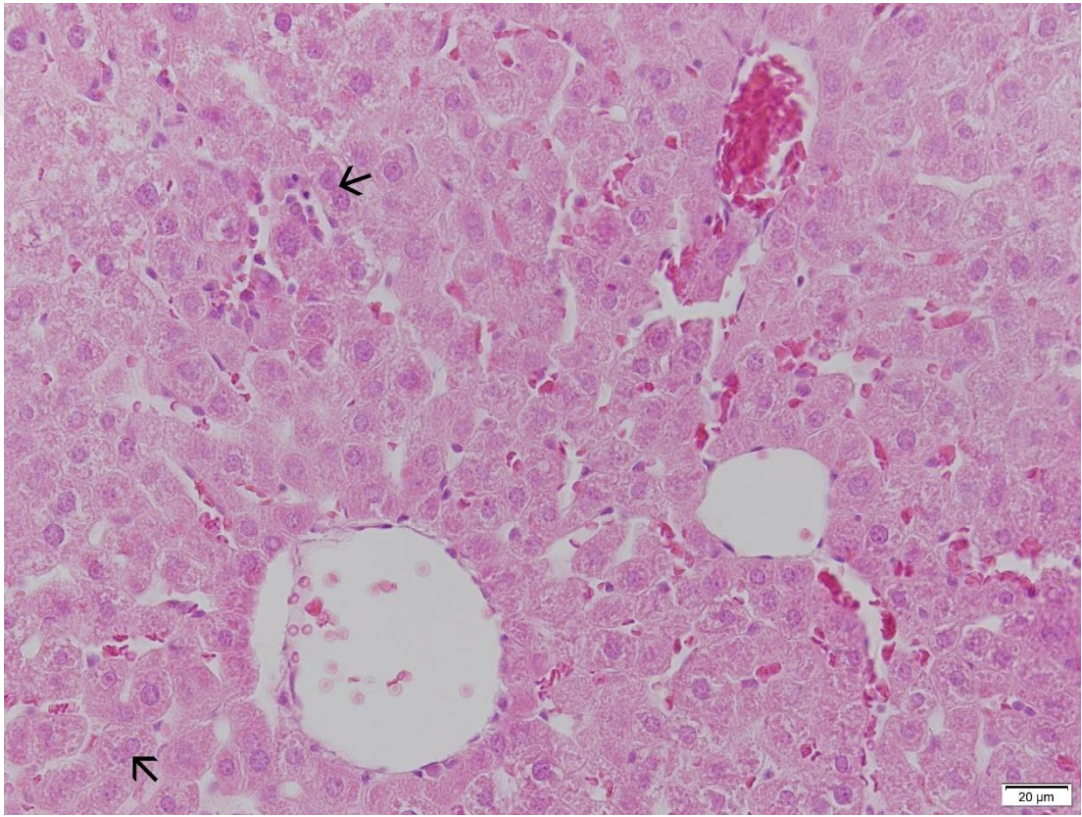


Şekil 3.20. Sipermetrin + JWH-133 Uygulanan Sıçanın Karaciğer Görünümü. Çok şiddetli parenkim dejenerasyonu (+++) gözlemlendi.



Şekil 3.21. Sipermetrin + JWH-133 Uygulanan Sıçanın Karaciğer Görünümü. Çok şiddetli parenkim dejenerasyonu ve nekroz gözlemlendi. Portal bölgede eritrositler ve safra kanalı hiperplazisi gözlemlendi.

Sadece CB2 agonisti JWH-133 verilen Grup 4'teki sıçanların (n:7): özellikle Glisson kapsülüne yakın sinuzoidlerde damarların hiperemik olduğu ve karaciğer epitel hücrelerinde hafif şiddette parenkim dejenerasyonu dikkati çekti (7/7). Bazı hepatositler nekrotik görünümde olduğu (5/7) Kupffer hücreleri sayıca arttığı farkedildi (7/7). Çift çekirdekli hepatositler mevcuttu (Şekil 3.22) (2/7) ve portal bölgede ayrıca hepatositler arasında tek tük lenfosit ve histiyositlere rastlandı (3/7).



Şekil 3.22. Sadece JWH-133 Verilen Sıçanın Karaciğer Görünümü. (Oklar-çift çekirdekli hepatosit).

Sipermetrin verilen grupta parenkim dejenerasyonu orta şiddetli (++) iken sipermetrin + JWH-133 verilen grupta çok şiddetli parankim dejenerasyonu ve nekroz (+++) meydana geldi. Sadece JWH-133 verilen grupta ise çok hafif parenkim dejenerasyonu gözlemlendi. Kupffer hücrelerinin kontrol grubuna göre grup 2, 3 ve 4'te arttığı gözlemlendi.

4. TARTIŞMA

Çeşitli zararlıları öldürmek için kullanılan en güvenli pestisitlerden biri olan ve Türkiye’de de ruhsatlı preparatları bulunan Sınıf II pretroidlerden sipermetrin hedef dışı olan memelilerde/insanlarda kronik maruziyete bağlı olarak toksik etkilere neden olabilmektedir. Sipermetrin toksik etkilerini oldukça farklı yollar üzerinden gösterir; bu yollar arasında nöromediatörlerin sentez ve salıverilmesinin modülasyonu, oksidatif stres, DNA hasarı, iyon kanallarından iyon (Na^+ , K^+ , Cl^- iyonu) giriş çıkışlarının modülasyonu bulunur (Singh ve ark., 2012; Suvetha ve ark., 2010). Kannabinoid sistem ise memelilerde ağrı, yangı, iştah, psikoaktivite gibi çeşitli etkinliklerden sorumlu olan ve keşfi nisbeten yeni bir sistemdir. Sipermetrine benzer şekilde reseptör aracılı veya aracısız çeşitli yollar üzerinden etkinlik gösterir (Felder ve ark., 1992). Kannabinoid reseptörlerin agonist ve antagonistleri ile yapılan araştırmalar doğal ya da sentetik çeşitli maddelerin bu reseptörlerle ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bazı organik fosforlu bileşikler üzerine yapılan son çalışmalar, bu bileşiklerin kannabinoid reseptörler ve endokannabinoidlerin yıkılmasından sorumlu yağ asid amid hidrolaz-FAAH ve monoasilgliserol lipaz-MGL üzerine doğrudan etki gösterdiklerini ortaya koymuştur (Quistad ve ark., 2001). Nallapaneni ve ark. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada kannabinoid reseptör agonisti WIN 55,212-2’nin organik fosforlu insektisitlerin etkilerini çeşitli mekanizmalar ile modifiye ettiğini göstermiştir. Yapılan başka araştırmalarda ise CB2 reseptör aktivasyonunun adenilat siklazı inhibe ettiği (Slipetz ve ark., 1995) ve hücre içi serbest Ca^{+2} seviyesinde artışa neden olduğu (Sugiura ve ark., 2000) belirtilmiştir. Bu çalışmada da CB2 agonisti JWH-133’ün sipermetrinin karaciğer üzerindeki toksik etkisini artırmasında yukarıda sayılan reseptör dışı mekanizmalardan birinin ya da birden fazlasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda sipermetrin uygulanan gruplarda ağırlık artışı hızlarında değişiklikler meydana gelmektedir. İslam ve ark. (2014)’nın yaptığı çalışmada 4 hafta boyunca farelere sipermetrin uygulanmış, sipermetrin verilen grupların başlangıca göre son ağırlıklarında düşme meydana gelmiştir. Diğer

yapılan çalışmalarda da sublethal dozda sipermetrin uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre ağırlık artışı azalmıştır (Aldana ve ark., 2001; Nair ve ark., 2015). Bu araştırmada da sipermetrin uygulanan gruplarda (Grup 2 ve Grup 3) kontrol grubuna (Grup 1) göre ağırlık artışında azalma görüldü. Sonuçlar Nair ve ark. (2015), Aldana ve ark. (2001) ve Islam ve ark. (2014)'ı ile benzer bulundu. Bu araştırmada Grup 3'teki ağırlık artışı diğerlerine göre daha zayıf kalmıştır. Bunun muhtemel sebebinin JWH-133'ün sipermetrinin sıçan üzerine olan toksik etkisini arttırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sipermetrin toksisitesinde siyatik sinir paralizi, salivasyon, ürkek davranışlar, uyuklama kaşınma, ataksi, konvulziyon ve aşırı duyarlılık semptomları gözlenmektedir (Aldana ve ark., 2001; Nair ve ark., 2015). Bu araştırmada da sipermetrin uygulanan Grup 2 ve Grup 3'te gözlenen klinik bulgular Nair ve ark. (2015) ve Aldana ve ark. (2001)'nın klinik bulgularıyla örtüşmektedir. Relatif karaciğer ağırlığına bakıldığında, Aldana ve ark. (2001)'nin yaptığı 7 günlük sipermetrin toksisite çalışmasında %20 artış kaydedilmiştir. Ancak, 28 günlük sipermetrin toksisitesi meydana getirilen bir başka çalışmada relatif karaciğer ağırlıklarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Yavaşoğlu ve ark., 2006). Bu çalışmada da gruplar arasında Yavaşoğlu ve ark. (2006)'nın bulgularında olduğu gibi relatif karaciğer ağırlığında önemli bir farklılık gözlenmedi.

Lipit peroksidasyon birçok insan ve hayvan hastalıklarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Meydana gelen lipit peroksidasyonun hücre membran bütünlüğünü ve sitoplazmik enzimlerin sızmasını bozduğu bilinmektedir (Bagchi ve ark., 1995). Yağ asitlerinin oksidasyonu, reaktif bir radikal tarafından yağ asitlerinin metilen gruplarından bir hidrojen atomunun koparılması ile başlar. Karbon merkezli radikal oluşumu ve daha sonra moleküler oksijenin bağlanması ile lipit hidroperoksitler meydana gelir. Lipit hidroperoksitleri, lipit peroksidasyonunun erken aşamasını oluşturur. Lipit hidroperoksitlerin yıkımı ile de biyoaktif aldehytler oluşur (Hussain ve ark., 2001). Bunlardan en önemlisi Malondialdehit (MDA) dir. Lipit hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA, lipit peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir. Lipit peroksidasyonun başlaması ile

süperoksit ve hidroksil gibi serbest radikaller meydana gelir ve hücrel hasara neden olurlar (Rahaman, 2003). Hücrel hasar karaciğer fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Manna ve ark., 2004). Antioksidan enzimler, biyolojik makromoleküllerin oksidatif hasardan korunması için ilk kullanılan korunma mekanizmalarıdır. Çalışmalar piretroidlere maruziyette sıçan ve farelerde oksidatif doku hasarının oluştuğunu göstermektedir (Yarsan ve ark., 2002; Yousef ve ark., 2006; Eraslan ve ark., 2015). Abdou ve ark. (2012)'nın sıçanlara 30 gün boyunca sipermetrin vermeleriyle oluşturdukları karaciğer hasarında oksidatif stres parametrelerinde MDA miktarında artma, GPx (glutasyon peroksidaz) ve SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesinde azalma kaydetmişlerdir. Manna ve ark. (2006) α -sipermetrin verilen sıçanların karaciğerinde MDA seviyesinde artış ve SOD aktivitesinde azalma gözlemişlerdir. Bu çalışmada sadece sipermetrin verilen sıçanların değerleri ile Manna ve ark. (2006) ve Abdou ve ark. (2012)'nin bulduğu sonuçlar benzerdir. Diğer bir ifadeyle sipermetrin, uygulama gruplarında toksisite oluşturmuştur.

Batkai ve ark. (2007)'1, farelerde hepatik iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında CB2 agonistinin lipit peroksidasyon üzerine etkisini MDA düzeyine bakarak incelemişlerdir. Çalışmada I/R gruplarında MDA miktarı artmış, I/R ve JWH-133 verilen gruplarda MDA miktarında azalma meydana gelmiştir. Bir diğer çalışmada karaciğer I/R hasarında CB2 agonisti olan HU-308, MDA miktarını azaltarak oksidatif stresi azaltmıştır (Rajesh ve ark., 2007a). Her iki çalışmada I/R modelinde yapılmış çalışmalardır ve CB2 agonistlerinin koruyucu etkisine bakılmıştır. Bu çalışmada ise JWH-133, sipermetrin ile yükselen MDA miktarını önemli ölçüde düşürememiştir. Sadece JWH-133 verilen grup değerleri (Grup 4) kontrol grubuna (Grup 1) göre kıyaslandığında, Grup 4'te MDA miktarında önemli düşüş kaydedildi ($p<0,05$). Beklenilenin dışında, Grup 3 ve Grup 4'te SOD ve GPx enzim aktivitelerinde önemli derecede düşme ($p<0,05$) meydana geldi. Bu çalışmada antioksidan enzimlerinin tükenmesi durumu, sipermetrinden kaynaklı ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumu, enzim substratının tükenmesi ve/veya transkripsiyon ve translasyon sürecinin downregülasyona uğraması ile açıklanabilir (Muthuviveganandavel ve ark., 2008). Farelerde yapılan deneysel diabette lipit

peroksidasyondan kaynaklı yükselmiş superoksit oluşumu antioksidan enzimlerden Superoksit Dismutaz (SOD) ve superoksit meydana getiren Ksantin oksidaz (oksidan enzim; superoksit oluşturur) inhibitörü allopurinol veya onun metaboliti oksipurinol ile normale döndürülmüştür (Desco ve ark., 2002; Matsumoto ve ark., 2003). Yapılan bir çalışmada CB2 agonisti JWH-133 superoksit oluşumunu düşürmüştür (Montecucco ve ark., 2009). Bu çalışmalar JWH-133'ün süperoksit miktarını düşürerek oksidatif stresi azaltabileceğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmada JWH-133'ün enzim aktivitesini ve MDA miktarını düşürmesi iki şekilde açıklanabilir; I) radikal üreten oksidan enzimlerin inhibisyonu ve/veya downregülasyonu ile superoksit oluşumunu azaltarak (Desco ve ark., 2002; Matsumoto ve ark., 2003), II) doğrudan antioksidantlar (Vit E, C vb.) gibi, oluşan superoksitleri azaltarak (Kashif ve ark., 2004; Yousef ve ark., 2006; Zaidi ve Banu, 2004). Bunun sonucu olarak, superoksitlerin miktarının azalması, antioksidan enzimlere (SOD ve GPx) olan ihtiyacı azalttığı için bu enzimler downregülasyona uğramış olabilir. JWH-133 bu etkiyi Grup 3 ve Grup 4'te göstermiş olabilir. Özellikle Grup 4'te MDA miktarındaki düşme bu enzimlerin downregülasyona uğramış olma ihtimalini güçlendirmektedir. Araştırmalarda antioksidan parametreler yönünden deneme grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda SOD/GPx, CAT/GPx oranlarına da bakılmaktadır (Hübner-Wozniak ve ark., 2005; Kostha ve ark., 1998). Hübner-Wozniak ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada oksijeni çok tüketen grup ile düşük tüketen gruplardaki oksidatif stres parametrelerine bakmışlardır. Çalışmada plazma MDA miktarı, yüksek oksijen tüketen grupta artış göstermesine rağmen, eritrositlerde CAT ve SOD aktivitesi, kanda GPx aktivitesinde gruplar arasında herhangi bir farklılık göstermemiştir. Ancak, enzim SOD/GPx ve CAT/GPx aktivite oranlarında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu sonuçlar yüksek oksijen alan gruplarda lipid peroksidasyon oluşumunun artmasına ve hidrojen peroksit birikimi ile ilişkili SOD/GPx dengesinin bozulabileceğini göstermektedir. Benzer sonuçlar Kostha ve ark. (1998)'inin yaptığı çalışmada da gözlenmiştir. Bu çalışmada da Grup 2'de SOD/GPx oranı diğer gruplara göre farklı bulunmuştur. Bu sonuçlar sipermetrin uygulanmasına bağlı oksidatif stresin meydana geldiğini göstermektedir. Diğer gruplar arasında ise istatistiki açıdan farkın bulunmaması ($p>0,05$) JWH-133 ligandının oksidatif stresi azaltıcı etkisinden kaynaklı olabilir.

Yapılan araştırmalarda, CB2 reseptör agonistlerinin hepatik hasara karşı endotelial hücre aktivasyonunu, adheziyon moleküllerini, yangısel sitokinleri, yangısel hücrelerin aktivasyonunu ve adhezyonunu azaltarak koruyucu etki oluşturduğu belirtilmektedir (Batkai ve ark., 2007; Rajesh ve ark., 2007a). Böylece sirozik hayvanlarda CB2 aktivasyonunun antifibrojenik etkisi anti-inflamator etkisiyle ilişkili olabilir. Artmış yangısel cevap oksidatif stresi daha çok artırır ve kötü bir döngü başlar, sonunda hücre ölümü ve organ disfonksiyonu ile sonuçlanır (Rajesh ve ark., 2007a). Bu araştırma sonuçlarına göre, JWH-133, normal sıçanlarda mevcut lipid peroksidasyonu azaltmış, ancak sipermetrin toksisitesinden kaynaklı lipid peroksidasyonu önemli miktarda azaltamamıştır. Grup 3'te oksidatif stresdeki azalışın sebebi CB2 reseptör aktivasyonu ile antiinflamatuvar etkiden kaynaklı olabilir.

Memeli karaciğeri, gastrointestinal sistem ve ksenobiyotik metabolizmasındaki rolü arasındaki ilişki sebebiyle ksenobiyotik stresin hedef organıdır. Bu gibi stres altında bozulmuş karaciğerin homeostazı organizmanın normal vücut fizyolojisini bozabilir. Sipermetrine maruz kalan canlılarda karaciğeri enzim aktiviteleri değişmektedir. Yapılan önceki çalışmalarda sipermetrin toksisitesine bağlı olarak serum ALP ve LDH düzeyinde artma meydana gelmiştir (Abdou ve ark., 2012; Bhushan ve ark., 2013a). Sipermetrin toksisitesinde serum AST ve ALT düzeyinin artması sipermetrin toksisitesinin göstergesidir (Abdou ve ark., 2012; Aldana ve ark., 2001; Brushan ve ark., 2013a; Manna ve ark., 2006; Nair ve ark., 2010; Pereira ve ark., 2006). ALT aktivitesi genel hepatosellüler hasarı belirtir. AST mitokondriyal enzimlerin en önemlisidir. Mitokondrinin zarar görmesi ve hepatositlerin zarar görmesi bu enzimlerin seruma sızmasına neden olur. Azalan antioksidan enzim aktivitesi ile birlikte yükselmiş AST ve ALT aktivitesi de piretroid kaynaklı oksidatif stresin üstesinden gelebilmek için bu enzimlerin üretiminde genetik anormallikleri gösterir (El-Tawil ve ark., 2001). ALP karaciğerde farklı hücresel fonksiyonlar için enerji makromoleküllerin biyosentezi ve metabolizmasında önemli rolü olan önemli bir hepatosit lizozomal enzimidir.

Bu çalışmada Grup 2 ile kontrol (Grup 1) grubu kıyaslandığında, Grup 2’de serum ALP ($p>0,05$) ve LDH ($p>0,001$) düzeylerinde düşme meydana gelirken, serum AST ($p>0,05$) ve ALT ($p<0,05$) düzeyinde artış gözlemlendi. Aldana ve ark. (2001)’nın yaptığı sipermetrin toksisite çalışmasında karaciğer enzimlerinin 5. güne kadar yükseldiğini sonrasında düşmeye başladığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki serum ALP ve LDH düzeyindeki düşme karaciğerin sürekli sipermetrin maruziyetine göstermiş olduğu dirençten kaynaklı olabilir. Glukoz değerinde ise Grup 4’te biraz yükselme olmakla birlikte ($p>0,05$) bütün gruplarda istatistiki açıdan anlamlı bir değişiklik görülmedi.

Avraham ve ark. (2008) farelerde tiyoasetamid kullanarak oluşturdukları akut karaciğer yetmezliğine (Fulminant Hepatik Failure-FNF) bağlı yükselmiş serum AST ve ALT düzeylerinin CB2 agonisti HU-308 ile azaldığı bildirilmiştir (Avraham ve ark., 2008). Benzer sonuçlar, Hepatik I/R hasarında da gözlemlenmiştir. I/R hasarına karşı CB2 agonistleri JWH-133 ve HU-910 kullanılarak plazma AST ve ALT seviyeleri düşürülmüştür (Batkai ve ark., 2007; Horvath ve ark., 2012). Karbontetraklorür (CCl_4) ile oluşturulmuş karaciğer hasarı modelinde CB2 agonisti, artmış serum AST ve ALT miktarını düşürmüştür (Teixeira-Clerc ve ark., 2010). Rajesh ve ark. (2007a) I/R modelinde LDH miktarının CB2 agonist ile düşürüldüğünü belirtmiştir. Yine bu araştırmada beklenenin aksine Grup 3’te Grup 2’ye göre ALP, AST ve ALT düzeylerinde önemli bir değişiklik meydana gelmedi ($p>0,05$). AST düzeyi ise Grup 3’te Grup 2’ye göre biraz yüksek bulundu ($p>0,05$). Buna karşılık Grup 3’te serum LDH seviyesinde tüm diğer gruplara göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). Tek JWH-133 verilen Grup 4 ile kontrol grubu (Grup 1) karşılaştırıldığında da Grup 4’te sadece serum ALT değerlerinde önemli derecede artış, ALP düzeyinde azalış meydana geldi. Sonuç olarak, subakut sipermetrin toksisitesinde CB2 agonisti JWH-133 karaciğer hasarını azaltamadı. Aksine Grup 3’te sipermetrinin toksik etkisini güçlendirdi. Bu araştırmada elde edilen sonuçların CCl_4 ve I/R karaciğer hasar modellerindekilerden farklı olması ve söz konusu araştırmalarda belirgin azalma ve artmaların kaydedilmesi, hasar modellerine göre oluşan etkilerin ve etki mekanizmalarının farklılıklar arz etmesi, etkilerin çok çabuk ve güçlü olması ile ilişkili olabilir.

Yapılan birçok çalışma CB1 ve CB2 reseptörlerin ekspresyonunun normal karaciğer dokusunda zayıf olduğunu, ancak deneysel karaciğer hasarında ve farklı etiyolojilerden kaynaklı karaciğer sirozunda önemli miktarda upregülasyona (ekspresyon artışı) uğradığını ortaya koymuştur (Batkai ve ark., 2007; Julien ve ark., 2005; Mendez-Sanchez ve ark., 2006; Schwabe ve ark., 2005; Teixeira-Clerc ve ark., 2006). Upregülasyon asimetrik hücreler, yangısel hücreler ve kanal üreme hücrelerinde fibröz septa boyunca dağılmış paraneoplastik olmayan hücrelerde meydana gelmiştir. CB1 ve CB2 reseptörler ayrıca aktive edilmiş (aktif edilmemişlerde yok) hepatik stellate hücrelerinde (HSC) (karaciğerde ana fibrojenik hücreler) ve insan karaciğerinde miyofibroblastlarda ekspresyon edilmiştir (Siegmond ve ark., 2007). Normal karaciğer hücrelerinde CB2 proteini saptanamamıştır. Ancak CB2 reseptörleri sirozik karaciğerde fibröz septa boyunca safra kanalı epiteliyal hücrelerinde ve yangısel hücrelerde, insan hepatik miyofibroblast hücre kültüründe, aktive edilmiş HSC hücrelerinde (Julien ve ark., 2005) ve alkolik olmayan steatozis ve steatohepatitiste hepatositlerinde, HSC’de ve kolangiyosit (cholangiocytes) (Mendez-Sanchez ve ark., 2006) ekspresyon edilmiştir. Karbontetraklorür ile oluşturulmuş karaciğer hasarı modelinde sirozda CB2 reseptör mRNA ekspresyonunun ve CB2 proteinin arttığını ve artışın portal aralık ve fibroz septada meydana geldiği bildirilmiştir (Munoz-luque ve ark., 2008; Teixeira ve ark., 2010). Bu çalışmada normal karaciğerde CB2 reseptörlerinin mRNA’sı tespit edildi. Ancak, gruplar arasında CB2 mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiki açıdan herhangi bir farklılık bulunamadı. Buna karşılık, immunohistokimyasal boyamada sipermetrin uygulanan grupların (Grup 2 ve Grup 3) fibro septanın arttığı bölümlerde, CB2 reseptör ekspresyonunda fibrosit/fibroblastlarda, mast hücrelerinde, Kupffer hücrelerinde, safra kanalı epitelinde ve intravenöz lökositlerde immunpozitiflik gözlemlendi. CB2 proteini ekspresyonu Grup 1’de çok zayıf (+) ve Grup 4’te zayıf (++) immunpozitiflik gösterdi. Ayrıca, bu çalışmada CB2’nin mRNA’sı ile protein ekspresyonu arasında önemli korelasyonun bulunmadığı dikkat çekti. Benzer araştırmalarla mukayese edildiğinde birçok genin mRNA seviyeleri ile ilgili protein seviyeleri arasında da korelasyonun olmadığı görülmüştür (Lichtinghagen ve ark., 2002; Sarro ve ark., 2010; Taquet ve ark., 2009; Tian ve ark., 2004; Vogel ve marcotte, 2012). Ayrıca, Schwanhauser ve ark. (2011, 2013) mRNA ve ilgili protein

yarı ömürleri üzerine yaptıkları çalışmada, proteinlerin (ortalama 46 saat) mRNA'dan (9 saat) 5 kat daha stabil olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, Montecuco ve ark. (2009) fare kalbinde I/R modelinde 30 dakika iskemiden sonra ve 24 saat reperfüzyondan sonra CB2 mRNA ekspresyonunun düştüğünü bulmuşlardır.

Transkripsiyon, mRNA yıkımı, translasyon ve protein yıkımlanması, protein konsantrasyonunu belirleyen önemli süreçlerdir. Mevcut çalışmadaki immunohistokimya ile RT-PCR sonuçlarının uyuşmama sebebi, en son sipermetrin uygulamasından 24 saat sonra dokuların alınması olabilir. Bu süre zarfında sipermetrinin etkisi zayıflamış ve mRNA yıkımlanmış olabilir. Ancak, CB2 reseptörünün yıkımlanması daha uzun sürdüğü için immun boyamada pozitiflik vermiş olabilir. Ayrıca, gruplar arasında CB2 mRNA ekspresyon farkının gözlenmemesinin sebebi karaciğerin asıl hücreleri olan hepatositlerde eksprese edilmemesi, ekspresyonun sadece hepatositlere göre çok az olan fibrojenik hücrelerde olması olabilir. Grup 2 ve Grup 3'te CB2 reseptör ekspresyonu gözlenen hücrelerin sipermetrin toksikasyonunun fizyopatolojisinde rolü vardır.

Yapılan bazı çalışmalarda histopatolojik bakıda sipermetrin verilen farelerin karaciğerinde genişlemiş sinüzoidler, hemoraji ve vakuol oluşumu, nekrotik hepatositler ve konjeste sentral ve portal venler, hepatosit membran hasarı, nükleer bölünme, nekrozis, karyoreksiz ve mononükleer ve Kupffer hücre sayısında artış gözlenmiştir. Ayrıca, bazı noktalarda nükleer hipertrofi ve çift çekirdekli hepatosit gözlenmiştir (Bhushan ve ark., 2013b; Islam ve ark., 2014; Kanbur ve ark., 2015; Mamun ve ark., 2014; Yavaşoğlu ve ark., 2006). Yapılan diğer çalışmalarda sipermetrin verilen sıçanlarda karaciğer histopatolojisinde dejeneratif ve damarsal değişiklikler gözlemlenmiştir (Nair ve ark., 2015). Bazı alanlarda hepatositlerde dejenerasyon, nekrotik değişiklikler, Kupffer hücre hiperplazisi kaydedilmiştir (Manna ve ark., 2004; Nair ve ark., 2015). In vivo ve in vitro çalışmalar, sipermetrinin karaciğer ATPaz aktivitesini önlediği, nekrozis, yangı ve hepatositlerde sitoplazmik hipertrofiye neden olduğunu göstermiştir (Aldana ve ark., 2001; El-Thoukhy ve Girgis, 1993). Mevcut çalışmada histopatolojik incelemede Grup 1

(kontrol grubu) normal karaciğer dokusu histolojisi gözlenmiştir. Grup 2'deki (sadece sipermetrin) tüm sıçanlarda damarlar hiperemik ve hepatositlerde orta şiddette (++) parenkim dejenerasyondan nekroza varan değişiklikler dikkati çekti. Remark kordonları dissosiye görünüme sahipti. Yer yer Kupffer hücre sayıları artmıştı. Dev çekirdekli ve çift çekirdekli hepatositlere rastlandı. Birçok sıçanda fokal mononükleer hücre infiltrasyonu gözlendi. Benzer sonuçlar sipermetrin toksisite çalışmalarında da gözlenmiştir (Aldana ve ark., 2001; Bhushan ve ark., 2013b; El-Thoukhy ve Girgis, 1993; Islam ve ark., 2014; Kanbur ve ark., 2015; Mamun ve ark., 2014; Manna ve ark., 2004; Nair ve ark., 2015). Elde edilen histopatolojik bulgular da sipermetrin uygulanan gruplarda toksisitenin oluştuğunu doğrulamaktadır.

CB2 reseptörlerin karaciğer hastalıklarındaki rolü çelişkilidir. Bazı araştırmacılar karaciğer hasarı boyunca koruyucu özellik gösterdiğini belirtmektedirler. Bu etkiler genellikle CB2 eksprese eden hepatik immun hücreler ve/veya hepatik miyofibroblastlar tarafından oluşturulan antifibrojenik etki veya antiinflamatuvar etkisine dayanmaktadır (Mallat ve ark., 2013; Louvet ve ark., 2011). CB2 reseptörlerin nonparenşimal hücrelerde erken tetiklenen birkaç akut karaciğer hasarı modellerinde CB2'nin iç ve/veya dış faktörlerle aktivasyonu bir koruyucu yol olarak tanımlanmıştır (Lotersztajn ve ark., 2008; Rajesh ve ark., 2007a). Yine hepatik iskemi/reperfüzyon hasarında CB2 aktivasyonu yangısel hücre infiltrasyonu ve yangısel mediatörlerin üretimini azaltarak hepatik hasara karşı korumuştur. Oksitadif ve/veya yangısel cevabın endokannabinoid üretimini tetiklemesi ve CB2 reseptörlerin ekspresyonunun artmasıyla bu hasara karşı koruyucu etki oluşmaktadır (Batkai ve ark., 2007; Rajesh ve ark., 2007a). Başka bir çalışmada CB2 reseptörlerin antifibrojenik rolü kronik karbontetraklorün intoksikasyonunda ortaya çıkartılmıştır. Araştırmacılar CB2 knockout (CB2 geninden yoksunlaştırılmış) farelerde, normal fareler ile karşılaştırıldığında önemli derecede karaciğer fibrozisinin meydana geldiğini görmüşlerdir. Aynı çalışmada CB2 reseptörleri kültüre edilmiş hepatik miyofibroblast ve aktive edilmiş stellate hücrelerde saptanmıştır. CB2 reseptörlerin aktivasyonu antifibrojenik etkiyi yani, hepatik miyofibroblastlar ve aktive edilmiş hepatik stellate hücrelerinde büyüme inhibisyonu ve apoptozisi tetiklemiştir. CB2

reseptörlerinin apoptotik ve büyümeyi inhibe edici etkisi COX-2 ve intrasellüler oksidatif stresin tetiklenmesine dayanır (Julien ve ark., 2005). Auguet ve ark. (2014) normal karaciğere sahip obez kadınlar, steatozisli karaciğere sahip kadınlar ve nonalkolik steatohepatitise sahip kadınların karaciğerinde CB2 ekspresyon seviyeleri arasında fark bulamamışlardır. Aynı çalışmada alkolik olmayan yağlı karaciğere sahip olan obez kadınlarda hem CB2 hem de antiinflamatuvar rolü olan adiponektin gen ekspresyonunun pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre, araştırmacılar CB2 reseptörü dual etkisi olan bir molekül olarak tanımlamışlardır. Bir başka çalışmada CB2 reseptörlerin inaktivasyonunun hem adipoz hemde obez hayvan karaciğerindeki yangıyı azalttığından söz edilmektedir. CB2 agonist JWH-133 yüksek yağlı besin ile beslenen farelerde adipoz doku yangısını artırmıştır. CB2 reseptörlerinin aktivasyonunun karaciğer yangısına önemli bir etkisi olmamıştır. Fakat erken dönemde adipoz doku yangısında artış yapmıştır. Yani, JWH-133 verilmesi yağ makrofaj infiltrasyonunu ve ilgili yangısel cevabı artırmıştır. Ayrıca, CB2'nin genetik ve farmakolojik inaktivasyonu 15 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda olduğu gibi uzun dönemde karaciğer ve adipoz doku yangısını azaltmıştır. Sonuç olarak JWH-133 yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerdeki hepatik steatozisi kötüleştirmiştir (Deveaux ve ark., 2009).

Bu çalışmada Grup 3'te (sipermetrin + JWH-133) damarlar hiperemik ve karaciğer epitel hücrelerinde çok şiddetli parenkim dejenerasyon (+++) ve nekroz gözlemlendi. Remark kordonları düzenini kaybetti. Kupffer hücrelerinde artışa rastlandı. Çok sayıda dev çekirdekli ve çift çekirdekli hepatositler dikkati çekti. Sipermetrin + JWH-133 agonisti verilen Grup 3'te patolojik durum daha da kötüleşti. Histopatolojik bulgulara göre Grup 3'te Grup 2'ye göre immun hücrelerin sayısında azalma göze çarptı. Bu CB2 reseptör aktivasyonunun antiinflamatuvar etkisinden kaynaklanabileceği düşünüldü. İlginç bir şekilde parankim dejenerasyonu ve nekroz Grup 3'te Grup 2'ye göre arttı. Diğer bir ifadeyle sipermetrin ile oluşturulan karaciğer hasarında CB2 agonisti JWH-133 kullanımı sağaltıcı etki gösteremedi. Bu aşamada endokannabinoid reseptörler sipermetrin toksisitesinin fizyopatolojik sürecine dâhil olmuş olabilir ve doğrulamak için daha fazla çalışma yapılması gerekir.

Sadece kannabinoid reseptör agonisti JWH-133 ligandının verildiği Grup 4'te damarlar hiperemik (Özellikle Glisson kapsülüne yakın sinuzoidler) görünümdeydi. Karaciğer epitel hücrelerinde hafif şiddette parenkim dejenerasyonu (+) dikkati çekti. Yer yer bazı hepatositler nekrotik görünümdeydi. İlginç bir şekilde Grup 4 kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Kupffer hücresi proliferasyonu gözlemlendi. Makrofajer sisteme ait hücreler bulundukları organlara göre farklı isimler alırlar. Bu sistemin karaciğerdeki öncüsü Kupffer hücreleridir (Hernandez-gea ve Friedman, 2011). CB2 reseptörlerinin farelerde hem genetik hem de farmakolojik inhibisyonu obesiteye bağlı adipoz doku makrofajlarının infiltrasyonunu düşürmüştür. Yangının başlangıcında JWH-133 verilmesi yağ makrofaj infiltrasyonunu arttırmıştır (Deveaux ve ark., 2009). Grup 2 ve Grup 3'te Kupffer hücrelerindeki artışın sipermetrin ile oluşturulan hepatotoksiteden kaynaklı bir immun yanıt olarak geliştiğini Grup 4'teki Kupffer sayındaki artışın ise JWH-133'ten kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Mast hücreleri doku hasarı veya immun düzensizlikler ile oluşturulan yangısal reaksiyonlarda önemli rol alır. Mast hücreleri yerel vasküler permeabilityi artıran ve etkili bir inflamasyon alanı oluşturmak için diğer lökositler için kemotaksis yapan hücreler olup birçok kimyasal molekülün sentezi ve salınımında görev alır. Bu moleküller fizyolojik değişiklikleri tetikleyerek hasarı başlatır (Taylor ve Metcalfe, 2001; Wedemeyer ve ark., 2000). Mast hücrelerinin siroz, fibroz, hepatit gibi karaciğer hastalık sürecinde ve hasar sonrası karaciğer rejenerasyonunda önemli rolü vardır. Her iki durumda da genellikle mast hücre sayısı artar. (Koda ve ark., 2000; Matsunaga ve ark., 2000; Nakamura ve ark., 1997; O'keeffe ve ark., 2002; Zweifel ve ark., 2005). CB2 mRNA mast hücrelerinde bulunmuştur (Facci ve ark., 1995; Samson ve ark., 2003). Karaciğerin I/R hasarında mast hücrelerinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan bir çalışmada Hepatik I/R hasarında mast hücrelerinin rolü olmadığı görülmüştür. Ancak bu çalışmanın in vitro olarak yapılması ve reperfüzyondan 1 saat sonra verilerin toplanmış olmasından dolayı mast hücreleri görülmemiş olabilir (Shibamoto ve ark., 2012). Başka bir araştırmada I/R modelinde mast hücrelerinin karaciğer hasarında önemli rolü olduğu bulunmuştur. Mast

hücrelerinin degranülasyonunun hepatik I/R hasarını artırdığı gözlenmiştir (Yang ve ark., 2014).

CB2 reseptör aktivasyonunun mast hücreleri üzerine çok değişik etkileri vardır. Farelerde yapılan bir çalışmada, mast hücre bağlantılı ödem oluşturan 48/80 bileşiği kullanılmıştır. JWH-133 in vivo olarak mast hücre kaynaklı ödemi azaltmıştır (Jonsson ve ark., 2006). Ayrıca, Hanus ve ark. (1999), HU-308'in kulak ödeminde araşidonik asidi düşürdüğünü bulmuşlardır. Ancak, sıçanlardan alınan peritoneal mast hücrelerine CB1 ve CB2 agonist ve antagonistlerin uygulanması histamin salınımını etkilememiştir (Bueb ve ark., 2001). Diğer bir çalışmada kobaylardan alınan serozal mast hücreleri CB2 ligandları mast hücresi aktivasyonunu NO ve PGE2 üreterek modüle etmiştir (Vannacci ve ark., 2004). Bu çalışmada Grup 1 ve Grup 4'te mast hücrelerinde CB2 reseptör ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak, sipermetrin verilen gruplarda (Grup 2 ve 3) karaciğer mast hücrelerinde CB2 reseptör ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Aşırı mast hücre aktivitesini modüle etme yeteneğine sahip mekanizmalar ve içsel moleküller hakkında çok az bilgi vardır. Sipermetrin toksisitesine bağlı karaciğer hasarında mast hücrelerinde CB2 reseptör ekspresyonunun artması bu hücreler düzeyinde söz konusu reseptörün farmakolojik aktivasyonu veya inaktivasyonu ile zararlı etkilerinin kontrol edilebileceğini göstermektedir. Sonuçlara göre, Kupffer hücresi gibi mast hücresinin de sipermetrin ile meydana getirilen karaciğer hasarının fizyopatolojisinde rolü olabilir.

Sipermetrin toksisitesinde imminohistokimyasal boyamalarda CB2 reseptörleri karaciğerde bazı hücrelerde artması kannabinoid sistemin toksisite sürecine dâhil olduğunu göstermektedir. Oksidatif stres parametrelerine bakıldığında JWH-133 oksidatif stresi azalttı ancak karaciğer hasarını azaltmadı. Histopatolojik ve karaciğer enzim aktiviteleri JWH-133'ün sipermetrinin toksik etkisini arttırdığını göstermektedir. Sonuçlara göre CB2 sipermetrin toksisitesinde sağıaltıcı etki gösteremedi aksine toksik etkiyi arttırdı.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Subakut sipermetrin toksisitesi oluşturulan ratlarda kannabinoid reseptörlerle toksik etki arasında bir ilişkinin olabileceği ve bu toksik etkinin CB2 agonisti JWH-133 ile düzeltilebileceğinin beklendiği bu araştırmada yapılan analiz sonuçlarının değerlendirmesine göre özellikle sipermetrin ve JWH-133'ün birlikte verildiği grupta toksik etkinin daha da arttığı, bunun muhtemel sebebinin gerek sipermetrinin ve gerekse kannabinoid agonistlerinin çok farklı yollar üzerinde etkinlik göstermesinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu araştırmanın diğer en önemli sonucu, sipermetrin toksisitesinde karaciğerde CB2 reseptör sıklığının artmış olmasıdır. Bu bulgu sipermetrinin fizyopatolojisinde kannabinoid sistemin (reseptör aracılı veya aracısız) bir rolü olabileceğini göstermektedir. Ancak, daha detaylı araştırmalarla bu sonucun doğrulanması gerekir.

Sipermetrinin özellikle nörotoksik etkisi göz önüne alınarak, gelecek araştırmalarda nöronlarda rastlanma sıklığı daha fazla olan CB1 reseptörlerle ilişkilerinin ortaya konulması, etki yollarının aydınlatılması bakımından yararlı olacaktır.

ÖZET

Sıçanlarda Sipermetrin Toksisitesine Bağlı Karaciğer Hasarında CB2 Agonisti JWH-133'ün Sağaltıcı Etkisinin Araştırılması

Sipermetrin tarımda, evde böcek kontrolünde besinlerin korunması ve hastalık vektör kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir sentetik piretroid insektisittir. Bu çalışmada, sipermetrin toksisitesinde ksenobiyotiklerin uğrak yeri olan karaciğerde kannabinoid reseptör 2 (CB2) ekspresyonunun olup olmayacağının ve CB2 agonisti JWH-133'ün sipermetrinin toksik etkisini antagonize edip etmeyeceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma, 44 adet Wistar Albino erkek sıçanda gerçekleştirilmiştir. Çalışma başlamadan 6 sıçan rastgele seçilerek kan ve karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Geriye kalan sıçanlar 4 gruba (sırasıyla, kontrol; sipermetrin; sipermetrin + JWH-133; JWH-133) ayrılmıştır. Sipermetrin 14 gün boyunca 125 mg/kg ağızdan, JWH-133 sipermetrin toksisitesinin son 4 günü boyunca 3 mg/kg dozda intraperitoneal yolla verilmiştir. Çalışmanın sonunda, sıçanlardan kan (serumda AST, ALT, ALP and LDH) alındıktan sonra dekapite edilerek karaciğer dokularında oksidatif stres enzimleri, CB2 yönünden immunohistokimya ve RT-PCR ve histopatolojik inceleme yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde SPSS 14.01 paket programı kullanıldı. Deneme grupları arasında CB2 mRNA miktarları bakımından fark bulunamamıştır. İmmunohistokimyal çalışmada CB2 reseptörleri normal karaciğer dokusunda çok zayıf gözlenmiştir. Ancak, sipermetrin uygulanan gruplarda CB2 reseptörlerinin ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Artış karaciğer fibrojenik, Kupffer, safra kanalı epitel ve mast hücrelerinde meydana gelmiştir. JWH-133, hem Grup 3 hem de Grup 4'te lipit peroksidasyonu düşürmüştür. Grup 3'te serum AST ve ALT enzim aktivitesi diğer gruplara göre artmıştır. Histopatolojik bakıda Grup 3 te Grup 2'ye göre parankim dejenerasyonu daha da güçlenmiştir.

Sonuçlara göre sipermetrin toksisitesinde karaciğerde CB2 reseptörlerinin özellikle hepatik fibrojenik hücrelerde ekspresyonunun arttığı ve JWH-133 lipit peroksidasyonu düşürmesine rağmen karaciğer hasarını azaltmadığı aksine sipermetrinin karaciğer üzerine zararlı etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Kannabinoid agonisti JWH-133'ün reseptör veya reseptör dışı yollar ile sipermetrinin toksik etkisini artırmış olabilir.

Anahtar Sözcükler: JWH-133, Kannabinoid Reseptör 2, Karaciğer, Sıçan, Sipermetrin.

SUMMARY

Investigation of the Therapeutic Effects Of CB2 Agonist JWH-133 in Cypermethrin Toxicity Induced Liver Damage in Rats

Cypermethrin is a synthetic pyrethroid insecticide used worldwide in agriculture, home pest control, protection of foodstuff and disease vector control. The objective of this study was to investigate whether the expression of cannabinoid receptor 2 (CB2) increase in the liver that is responsible for the metabolism of xenobiotics in cypermethrin toxicity and, whether CB2 agonist, JWH-133, prevents the toxic effect of cypermethrin.

In this study, 44 male Wistar Albino rats were used. Six rats were decapitated to take their blood and liver samples and used as zero day control before the start of the study. The remaining rats were divided into four groups (respectively, control; cypermethrin; cypermethrin + JWH-133; JWH-133). Cypermethrin (125 mg kg^{-1} body weight for 14 days) was administered orally. JWH-133 (3 mg kg^{-1} body weight for last 4 days of cypermethrin toxicity) was administered by intraperitoneally. At the end of the fourteenth day, after collecting blood, rats were decapitated to take liver samples. The assessment was based on hepatic marker enzymes (AST, ALT, ALP, LDH) in serum and oxidative stress parameters (SOD, GPx, MDA) in liver samples. CB2 receptors were characterized in liver by immunohistochemistry and RT-PCR. Liver damage was assessed by histopathological examination. SPSS 14.01 packet program was used for evaluation of the results. There was no difference among groups in terms of level of CB2 mRNA. CB2 receptors were weakly detected in normal liver tissue. In contrast, liver of rats treated with cypermethrin showed a strong CB2 immunostaining in fibrocyte/fibroblast cells, bile duct epithelial cells, Kupffer cells and mast cells. JWH-133 decreased lipid peroxidation in both group 3 and group 4. There are increases in serum hepatic enzyme activities (AST, ALT) in group 3. Histopathologic examination of the liver indicated a significant injury in group 3 compared with group 2.

In conclusion, these data demonstrate that CB2 receptors are highly up-regulated in the liver exposed by cypermethrin, predominantly in hepatic fibrogenic cells and while JWH-133 decreases the lipid peroxidation in liver, it can not reduce the liver damage. On the contrary, JWH-133 strengthens the influence of cypermethrin on the liver. The CB2 agonist JWH-133 may stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways to improve the influence of cypermethrin effects on liver.

Keywords: Cannabinoid Receptor Type 2, Cypermethrin, JWH-133, Liver, Rat,

KAYNAKLAR

- ABDOU HM, HUSSIEN HM, YOUSEF MI (2012). Deleterious effects of cypermethrin on rat liver and kidney: protective role of sesame oil. *Journal of Environmental Science and Health*, **47**: 306-314.
- AHLUWALIA J, URBAN L, BEVAN S, NAGY I (2003). Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci.*, **17**: 2611–2618.
- ALDANA L, TSUTSUMI V, CRAIGMILL A, SILVEIRA MI, DE MEJIA EG (2001). Alfa-Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicology Letters*, **125**: 107-116.
- AMER SM, IBRAHIM AA, EL-SHERBENY KM (1993). Induction of chosomal aberrations and sister chromatid exchange in vivo and in vitro by the insecticide cypermethrin. *J. Appl. Toxicol.*, **13**: 341-345.
- AMVEG EL, WESTON DP, UREDA NM (2005). Use and toxicity of pyrethroid pesticides in Central Valley, California USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, **24**: 966-972.
- AUGUET T, BERLANGA A, GUIU-JURADO E, TERRA X, MARTINEZ S, AGUILAR C, FILIU E, ALIBALIC A, SABENCH F, HERNANDEZ M, CASTILLO DD, RICHART C (2014). Endocannabinoid receptors gene expression in morbidly obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *BioMed Research International*, **2014**: 7.
- AVRAHAM Y, ZOLOTAREV O, GRIGORIADIS NC, POUTAHIDIS T, MAGEN, I, VOROBIAV L, ZIMMER A, ILAN Y, MECHOULAM R, BERRY EM (2008). Cannabinoids and capsaicin improve liver function following thioacetamide-induced acute injury in mice. *Am J Gastroenterol*, **103**: 3047–3056
- BAGCHI M, BAGCHI D, ADICKES E, STOHS SJ (1995). Chronic effects of smokeless tobacco extract on rat liver histopathology and orotextion of HSP-90. *J. Environ. Pathol. Oncol.*, **14**(2): 61-68
- BAKER D, PRYCE G, DAVIES WL, HILEY CR (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.*, **27**: 1–4.
- BASAVARAJAPPA BS (2007). Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr Neuropsychopharmacol.*, **5**: 81–97.
- BATKAI S, OSEI-HYIAMAN D, PAN H, EL-ASSAL O, RAJESH M, MUKHOPADHYAY P, HONG F, HARVEY-WHITE J, JAFRI A, HASKO G, HUFFMAN JW, GAO B, KUNOS G, PACHER P (2007). Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.*, **21**: 1788–800.
- BAYNES RE (2009). Ectoparasitocides. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Ed.: Riviere, J.E., Papich, M.G., Ninth Edition, Wiley-Blackwell, USA. p.:1192-1196.
- BELTRAMO M, BERNARDINI N, BERORELLI R, CAMPANELLA M, NICOLUSSI E, FREDDUZZI S, REGGIANI A (2006). CB2 receptor-mediated Antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, **23**: 1530-1538.

- BHUSHAN B, PANDE S, SAXENA N, SAXENA PN (2013a). Serum biochemical responses under stress of cypermethrin in albino rat. *Environmental and Experimental Biology*, **11**: 81-89.
- BHUSHAN B, SAXENA PN, SAXENA N (2013b). Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cygluthrin. *Arh Hig Rada Toksikol.*, **64**: 5767.
- BISWAS KK, SARKER KP, ABEYAMA K, KAWAHARA K, IINO S, OTSUBO Y, SAIGO K, IZUMI H, HASHIGUCHI T, YAMAKUCHI M, YAMAJI K, ENDO R, SUZUKI K, HIMIZUMI H, MARUYAMA I (2003). Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatolog.*, **38**(5): 1167–77.
- BOULAIS N, MISERY L (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol.*, **18**: 119–127.
- BUCKLEY NE, BURBRIDGE D, BURANAPRAMEST M, FERGUSON T, PAAU RY (2006). Experimental methods to study the role of the peripheral cannabinoid receptor in immune function. *Methods Mol Med*, **123**: 19–40.
- BUEB J, LAMBERT DM, TSCHIRHART EJ (2001). Receptor-Independent effects of natural cannabinoids in rat peritoneal mast cell in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1538**: 252-259.
- CABRAL GA, GRIFFIN-THOMAS L (2009). Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med*, **11**:e3.
- CAMILLERI P (1984). Alkaline hydrolysis of some pyrethroid insecticides. *J. agris. Fod. Chem.*, **32**: 1122-1124.
- CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**: 816–824.
- COLLINS P, CAPPELLO S (2006). Cypermethrin toxicity to aquatic life: bioassays for the freshwater prawn *palaeomonetes argentinus*. *Arch. environ. Contam. Toxicol*, **51**: 79-85.
- COOMBS AD, CARTER BI, HEND RW, BUTTERWORTH SG, BUCKWELL AC (1976). Toxicity studies on the insecticide WL 43467: summary results of preliminary experiments, Tech. Rep. TLGR.0104.76, Shell Toxicology Laboratory (Tunstall). Submitted to the WHO by Cyanamid, Wayne, NJ, USA.
- ÇALIŞKAN M, ERKMEN B, YERLİ SV (2003). The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. *Environ. Toxicol. Phar.*, **14**: 117-120.
- DAS BK, MUKHERJEE SC (2003). Toxicity of cypermethrin in labo rohita fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **134**: 109-121.
- DESCO MC, ASENSI M, MARQUEZ R, MARTINEZ-VALLS J, VENTO M, PALLARDO FV, SASTRE J, VINA J (2002). Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*, **51**: 1118–1124.
- DESSOUKI AA, HASSAN AGA, ALI SA, LOUTHFY NM, AHMED MT (2013). Alterations in P53 gene, testicular and hepatic tissues of albino rats due to profenofos administration: a possible protective effect of vitamin c. *J. Environ. Immunol Toxicol.*, **1**: 26-34.
- DEVANE WA, DYSARZ FA III, JOHNSON MR, MELVINE LS, HOWLETT AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, **35**: 605-613.

- DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**: 1946-1949
- DEVEAUX V, CADOU DAL T, ICHIGOTANI Y, TEIXEIRA-CLERC F, LOUVET A, MANIN S, NHIEU JT, BELOT MP, ZIMMER A, EVEN P, CANI CK, BURCELIN R, BERTOLA A, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, GUAL P, MALLAT A, LOTERSZTAJN S (2009). Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis. *PLoS One*, **4**(6): e5844.
- DI MARZO V, PETROSINO S (2007). Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol*, **18**: 129–40.
- DI MARZO V, BIFULCO M, AND DE PETROCELLIS L (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev. Drug. Discov.*, **3**: 771–784.
- DOBSIKOVA R, VELISEK J, WLASOW T, GOMULKA P, SVOBODOVA Z, NOVOTNY L (2006). Effects of cypermethrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuro. Endocrinol. Lett.*, **27**(suppl.2): 91-95.
- EL-BENDARY HM, SHAKER MH, SALEH AA, NEGM SE, KHADEY ME, ELDEN FAH (2014). Histopathological changes associated with exposure of male mice to prefenofos and chlorpyrifos. *Ann. Res. Rev. Biol.*, **4**(5): 766-777.
- EL-DAMATY EMA, FARRAG AH, ROWAYSHED G, FAHMY HM (2012). Biochemical and histopotolocial effects of systemic pesticides in some functional organs of male albino rat. *J. Appl. Sci. Res.*, **8**(11):5459-5469.
- ELMES SJR, WINYARD LA, MEDHURST SJ, CLAYTON NM, WILSON AW, KENDALL DA, CHAPMAN V (2005). Activation of CB1 and CB2 rreceptors attenuates the induction and maintainence of inflammatory pain in the rat. *Pain*, **118**: 327-335.
- ELPHICK MR, EGERTOVAÂ M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. [Review]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 381±408.
- EL-TAWIL OS, ABDEL-REHMAN MS (2001). The role of enzyme induction and inhibition on cypermethrin hepatotoxicity. *Pharmacol Res*, **44**: 33-40.
- EL-TOUKHY MA, GIRGIS RS (1993). In vivo and in vitro studies on the effect of larvin and cypermethrin on adenosine triphosphatase activity of male rats. *J. Environ. Sci. Health*, **B28** (5): 599–619.
- ERASLAN G, KANBUR M, SILIG Y, KARABACAK M, SOYER SARLCA Z, SAHIN S (2015). The acute and chronic toxic effect of cypermethrin, propetamphos, and their combinations in rats. *Environmental toxicology*, DOI: 10.1002/tox.22147
- ERDOĞAN BY (2010). Samsun’da yaygın olarak kullanılan pestisitlerin sağlığa ve çevreye etkileri, *Alinteri*, **19**(b): 28-35.
- FACCI L, FALTOSO R, ROMANELLO S, BURIANI A, SKAPER SD, LEON A (1995). Mast celles express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**: 3376-3380.
- FAO (2016). Cypermethrin. Erişim adresi:[<http://www.fao.org/docrep/w4601e/w4601e07.htm>]. Erişim tarihi: 12/03/2016.

- FELDER CC, VELUZ JS, WILLIAMS HL, BRILEY EM, MATSUDA LA (1992). Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol*, **42**: 838–845.
- FRIDE E (2004). The Endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre-and postnatal life. *Eur J Pharmacol*, **500**: 289-297.
- GABBAY E, AVRAHAM Y, ILAN Y, ISRAELI E, BERRY EM (2005). Endocannabinoids and liver disease. *Liver Int*, **25**: 921–926.
- GIDA ve KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2016). Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler. Erişim adresi: [<http://www.gkgm.gov.tr/vtu/>]. Erişim tarihi: 12/03/2016.
- GİRAY B, GURBAY A, HINCAL F (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented vitamin E or allopurinol, *Toxicol. Lett.*, **118**: 139-146.
- GORELL JM, JOHNSON CC, RYBICKI BA, PETERSON EL, RICHARDSON RJ (1998). The risk of parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *American Academy of Neurology*, **50**(5): 1346-1350.
- GREWAL G, WERMA PK, DHAR VJ, SRIVASTAVA AK (2009). Toxicity of subacute oral administration of cypermethrin in rats with special reference to histopathological changes. *International Journal of Green Pharmacy*, **3**(4): 293-299.
- HALL BE, VICKERS JA, HOPKINS JA (1980). A study to determine the bioaccumulation of 14c-cypermethrin radioactivity in the rat following repeated oral administration, Report No. 2487-72/20, WHO.
- HAMILTON DJ (2015). Cypermethrin. Erişim adresi: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation08/Cypermethrin.pdf]. Erişim Tarihi: 12/12/2015.
- HANUS L, BREUER A, TCHILIBON S, SHILOAH S, GOLDENBERG D, HOROWITZ M, PERTWEE RG, ROSS RA, MECOULAM R, FRIDE E (1999). HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**: 14228– 14233.
- HARATYM-MAJ A (2002). Haematological alternations after pyrethroids poisoning in mice. *Ann. Agric. environ. Med.*, **9**: 199-206.
- HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN SL (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol.*, **6**: 425-456.
- HEZODE C, ROUDOT-THORAVALL F, NGUYEN S, GRENARD P, JULIEN B, ZAFRANI ES, PAWLOTSKY JM, DHUMEAUX D, LOTERSZTAJN S, MALLAT A (2005). Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, **42**: 63-71.
- HORVATH B, MAGID L, MUKHOPADHYAY P, BATKAI S, RAJESH M, PARK O, TANCHIAN G, GAO RY, GOODFELLOW CE, GLASS M, MECOULAM R, PACHER P (2012). A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, **165**: 2462-2478.

- HUFFMAN JW, LIDDLE J, YU S, AUNG MM, ABOOD ME, WILEY JL, MARTIN BR (1999). 3-(10,10-Dimethylbutyl)-1-deoxy-D8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 Receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **7**: 2905-2914.
- HUSSAIN K, SCOTT BR, REDDY SK, SOMANI SM (2001). Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol*, **25**: 89-97.
- HUBER-WOZNAK E, LUTOSLAWSKA G, PANCZENKO-KRESOWSKA B, SITKOWSKI D. (2005). Resting plasma concentration of reduced glutathione and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and on the antioxidant enzyme activities in Blood. *Biology of Sport*, **22**: 151-161.
- INCHEM (2016). Cypermethrin, Erişim adresi: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim163.htm>. Erişim tarihi: 11/03/2016.
- INSTITORIS L, UNDEGER U, SEROKI O, NEHEZ M, DESI I (1999). Comparison of detection sensitivity of Immuno- and genotoxicological effects of sub acute cypermethrin and permethrin exposure in rats. *Toxicology*, **137**: 47-55.
- ISLAM MS, HOQUE MM, FERDOUSI Z (2014). Cypermethrin-induced changes in body morphometrics and histopathology of liver and kidneys in the swiss albino mice mus musculus L. *Journal of Global biosciences*, **3**(7): 1004-1015.
- IZZO AA, CAMILLERI M (2008). Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut*, **57**: 1140-1155.
- IVERSEN L (2003). Cannabis and the brain. *Brain*, **126**: 1252-1270.
- JEYARATNAM J (1990). Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Statistics Quarterly*, **43**(3): 139-144.
- JONES D (2015). Environmental Fate of Cypermethrin. Erişim adresi: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/cyperm.pdf>. Erişim tarihi: 12/12/2015.
- JONSSON K, PERSSON E, FOWLER CJ (2006). The cannabinoid cb2 receptor selective agonist jwh-133 reduces mast cell oedema in response to compound 48/80 in vivo but not the release of β -hexosaminidase from skin slices in vitro. *Life sciences*, **78**: 598-606.
- JULIEN B, GRENARD P, TEIXEIRA-CLERC F, VAN NHIEU JT, LI L, KARSAK M, ZIMMER A, MALLAT A, LOTERSZTAJN S (2005). Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor cb2 in the liver. *Gastroenterology*, **128**: 742-755.
- KAKKO I, TOIMELA T, TAHTI H (2003). The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin, *Chemosphere*, **51**: 475-480.
- KALE M, ROTHORE N, JOHN S, BHATNAGAR D (1999). Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species, *Toxicol. Lett.*, **105**: 197-2005.
- KANBUR M, ERARSLAN G, İNCE S, ALTINTAŞ L, LİMAN BC, ÇAKIR BAYRAM L (2015). The Effects of propetomphos, cypermethrin and propetamphos-cypermethrin combination on some biochemical and histopathological parameters in mice. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **21**(2): 187-194.
- KASHIF SM, ZAIDI R, BANU N (2004). Antioxidant Potential of Vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica chimica acta*, **340**: 229-233.

- KOSTKA T, DRAI JS, BERTHOUSSE E, LACOUR JR, BONNEFOY M. (1998) Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. *Int.J.Sports Med.*, **19**: 462-467
- KLEIN TW, NEWTON C, LARSEN K, LU L, PERKINS I, NONG L, FRIEDMAN H (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol.*, **74**: 486-496.
- KODA W, HARADA K, TSUNEYAMA K, KONO N, SASAKI M, MATSUI O, NAKANUMA Y (2000). Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest.*, **80**: 1007-17.
- KOMOROWSKI J, STEPIEN H (2007). The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Hig Med Dosw*, **61**: 99-105.
- KUPCZYK P, REICH A, SZEPIETOWSKI JC (2009). Cannabinoid system in the skin – a possible target for future therapies in dermatology. *Experimental Dermatology*, **18**:669-679.
- LA CROCE G, BETTIGA A, FRESCHI M, MONTORSI F, KUCZYK M, UCKERT S (2015). Expression and distribution of cannabinoid receptors in the human seminal vesicles. *The Journal of Urology*, **193**(42):e630
- LAVON I, SHEININ T, MEILIN S, BITON E, WEKSLER A, EFRONI G, BAR-JOSEPH A, FINK G, AVRAHAM A (2003). A novel synthetic cannabinoid derivative inhibits inflammatory liver damage via negative cytokine regulation. *Mol Pharmacol*, **64**(6): 1334-44.
- LEE T, LEE K, CHANG H (2010). Modulation of the cannabinoid receptors by andrographolide attenuates hepatic apoptosis following bile duct ligation in rats with fibrosis. *Apoptosis*, **15**: 904-914.
- LICHTINGHAGEN R, MUSHOLT PB, LEIN M, ROMER A, RUDOLPH B, KRISTIANSEN G, HAUPTMANN S, SCHNORR D, LOENING SA, JUNG K (2002). Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. *Eur Urol.*, **42**(4): 398-406.
- LOTERTSZTAJN S, TEIXEIRA-CLERC F, JULIEN B, DEVEAUX V, ICHIGOTANI Y, MANIN S, (2008). CB2 receptors as new therapeutic targets for liver diseases. *Br J Pharmacol*, **153**: 286-289.
- LOUVET A, TEIXEIRA-CLERC F, CHOBERT MN, DEVEAUX V, PAVOINE C, ZIMMER A, PECKER F, MALLAT A, LOTERTSZTAJN S (2011). Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology*, **54**(4): 1217-1226.
- MACCARRONE M, LORENZON T, BARI M, MELINO G, FINAZZI-AGRO A (2000). Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem*, **275**(41): 31938-45.
- MACCARRONE M, ROSSI S, BARI M, De CHIRA V, FEZZA F, MUSELLA A, GASPERI V, PROSPERETTI C, BERNARDI G, FINAZZI-AGRO A, CRAVATT BF, CENTONZE D (2008) Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci.*, **11**: 152-159.
- MAGEN I, AVRAHAM Y, ACKERMAN Z, VOROBIEV L, MECHOULAM R, BERRY EM (2009) Cannabidiol Ameliorates Cognitive and Motor Impairments in Mice with Bile Duct Ligation. *J Hepatol*, **51**: 528- 534

- MALLAT A, LOTERSZTAJN S (2008). Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **294**: G9-G12.
- MALLAT A, TEIXEIRA-CLERC F, LOTERSZTAJN S (2013). Cannabinoid signaling and liver therapeutics, *Journal of Hepatology*, **59**(4): 891–896,
- MALLAT A, TEIXEIRA-CLERC F, DEVEAUX V, LOTERSZTAJN S (2007). Cannabinoid receptors as new targets of antifibrosing strategies during chronic liver diseases. *Expert Opin Ther Targ x*, **11**: 403-409.
- MAMUN MAA, ILLA IJ, HAQUE KMF, FERDOUSI Z. (2014). Histological study of the effects of cypermethrin on liver and kidney tissues of mice model. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **9**(5): 121-128.
- MANNA S, BAHTTACHARYYA D, MANDAL TK, DAS S. (2006). Sub-Chronic toxicity study of alfa-cypermethrin in rats. *Iranian journal of Pharmacology and Therapeutics*, **5**: 163-166.
- MANNA S, BHATTACHARYA D, BASAK DK, MANDAL TK (2004). Single oral doze toxicity study of a-cypermethrin in rats. *Indian J. Pharmacol.*, **36**: 25-28.
- MASSA F, STORR M, LUTZ B (2005) The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J. Mol. Med.*, **83**: 944–954.
- MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**: 561–564.
- MATSUMOTO S, KOSHIIISHI I, INOUCHI T, NAWATA H, UTSUMI H (2003). Confirmation of superoxide generation via Xantine Oxidase in streptozotocin induced diabetic mice. *Free Radic Res.*, **37**(7): 767-72.
- MATSUNAGA Y, TERADA T (2000). Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver*, **20**: 152–6.
- MAUND SJ, CAMPBELL PJ, GIDDINGS JM, HAMMER MJ, HERNRY K, PILLING ED, WHEELER JR (2012). Ecotoxicology of synthetic pyrethroids. topics in current Chemistry, **314**: 137-165.
- MC EVEN FL, STEPHENSON GL (1979).The use and significiance of pesticides in the environment, John Wiley & Sons Pub., New York. s.538
- MCKALLIP RJ, LOMBARD C, MARTIN BR, NAGARKATTI M, NAGARKATTI PS (2002). Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanis of immunosuppression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.*, **302**(2): 451–65.
- MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **50**: 83-90.
- MENDEZ-SANCHEZ N, ZAMORA-VALDES D, PICHARDO-BAHENA R,BARREDO-PRIETO B, PONCIANO-RODRIQUEZ L, CHAVEZ-TAPIA NC, BAPTISTA-CONZALEZ HA, URIBE M (2006). Endocannabinoid receptor cb2 in nonalcoholic fatty liverdisease. *Liver Int*, **27**: 215–9.
- MOEZI L, GASKARI SA, LIU H, BAIK SK, DEHPOUR AR, LEE SS (2006). Anandamide mediates hyperdynamic circulation in cirrhotic rats via cb(1) and vr(1) receptors. *Br J Pharmacol*, **149**: 898–908.

- MONTECUCCO F, LENGLET S, BRAUNERSREUTHER V, BURGER F, PELLI G, BERTOLOTTO M, MACH F, STEFFENS S (2009). CB2 Cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a Mouse of ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **46**: 612-620.
- MUNOZ-LUQUE J, ROS J, FERNANDEZ-VARO G, TUGUES S, MORALES-RUIZ M, ALVAREZ CE, FRIEDMAN SL ARROYO V, JIMENEZ W (2008). Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid cb2 receptor in the cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **324**: 475-83.
- MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**: 61-65.
- MUTHUVIVEGANALDAVEL V, MUTHURAMAN P, MUTHU S, SRIKUMAR K (2008). A study on low dose cypermethrin induced histopathology, lipid peroxidation and marker enzyme changes in male rat. *Pest Biochem. Physiol.*, **91**: 12-16
- NAIR RR, ABRAHAM MJ, NAIR ND, LALITHAKUNJAMMA CR, ARAVINDAKSHAN CM (2010). Hematological and biochemical profile in sublethal toxicity of cypermethrin in rats. *Int. J. Biol. Med. Res.*, **1**: 211-214.
- NAIR RR, ABRAHAM MJ, LALITHAKINJAMMA CR, NAIR ND, ARAVINDAKSHAN CM (2015). A pathomorphological study of the Sublethal Toxicity of Cypermethrin in Sprague Dawley Rats. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, **1**(2): 179-181.
- NALLAPANENI A, LIU J, KARANTH S, POPE C (2006). Modulation of paraoxon toxicity by cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Toxicology*, **227**: 173-183.
- NAKAMURA A, YAMAZAKI K, SUZUKI K, SATO S (1997). Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, **92**: 2245-2249.
- O'KEEFFE C, BAIRD AW, NOLAN N, MCCORMICK PA (2002). Mast cell hyperplasia in chronic rejection after liver transplantation. *Liver Transpl*, **8**: 50-7.
- O'SULLICAN SE, KENDALL DA, RANDALL MD (2004). Characterisation of the vasorelaxant properties of the novel endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamide (NADA). *Br J Pharmacol.*, **141**(5):803-812
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**: 351-358.
- PACHER P, BATKAI S, KUNOS G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.*, **58**: 389-462.
- PACHER P, GAO B (2008). Endocannabinoids and liver disease. iii. endocannabinoid effects on immune cells: implications for inflammatory liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **294**(4): G850-G854.
- PAGLIA DE, VALENTINE WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase *J. Lab. Clin. Med.*, **70**:158-169.
- PANDIT S, SUR TK, JANA U, DEBNATH PK, SEN S, BAHTTACHARYA D (2005). Prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats by Adhatoda vasica leaves. *Indian J. Pharmacol.*, **36**: 312-320.

- PARFIENIUK A, FLISIAK R (2008). Role of cannabinoids in chronic liver diseases. *World J Gastroenterol*, **14**(40): 6109-6114.
- PATEL S, PANDEY AK, BAJPAYEE M, PARMAR D, DHAWAN A (2006). Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **67**(2): 176-183.
- PEREIRA C, MAPUSKAR K, RAO CV (2006). Chronic toxicity of diethyl phyhalate in male wistar rats. a dose response study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **45**: 169-177.
- PORTER AC, SAUER JM, KNIERMAN MD, BECKER GW, BERNA MJ, BAO J, NOMIKOS GG, BYMASTER FP, LEESE AB, FELDER CC (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.*, **301**(3): 1020-1024.
- QUISTAD GB, SPARKS SE, CASIDA JE (2001). Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **173**: 48–55.
- RAHAMAN K (2003). Garlic and aging: new insight into a old remedy. *Ageing Res. Lett.*, **151**: 357-365.
- RAJESH M, PAN H, MUKHOPADHYAY P, BATKAI S, OSEI-HYIAMAN D, HASKO' G, LIAUDET L, GAO B, PACHER P (2007A) Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/ reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *J Leukoc Biol*, **82**: 1382–1389
- RAJESH M, MYKHOPADHYAY P, BATKAI S, HASKO G, LIAUDET L, HUFFMAN JW, CSISZAR A, UNGVARI Z, MACKIE K, CHATTERJEE S, PACHER P (2007B). CB2-receptor stimulation attenuates TNF-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **293**: H2210-H2218.
- ROS J, CLA`RIA J, TO-FIGUERAS J, PLANAGUMA A, CEJUDO-MARTIN P, FERNANDEZ-VARO G, MARTIN-RUIZ R, ARROYO V, RIVERA F, RODES J, JIMENEZ W (2002). Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology*, **122**: 85–93.
- SAMSON M, SMALL-HOWARD A, SHIMODA LMN, KOBLAN-HUBERSON M, STOKES AJ, TURNER H (2003). Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cells. *J Immunol*, **170**: 4953-4962.
- SANTONI G, CANTALAMESSA F, MAZZUCCA L, ROMAGNOLI S, PICCOLI M (1997). Prenatal exposure to cypermethrin modulates rat NK cell cytotoxic functions. *Toxicology*, **120**: 231-242.
- SARRO SM, UNRUH TL, ZUCCOLO J, SANYAL R, LUIDER JM, AUER-GRZESIAK IA, MANSOOR A, DEANS JP (2010). Quantification of CD20 mRNA and protein levels in chronic lymphocytic leukemia suggests a post-transcriptional defect. *Leuk Res*, **34**(12): 1670-1673.
- SCHLOSBERG JE, KINSEY SG, LICHTMAN AH (2009) Targeting fatty acid amide hydrolase (FAAH) to treat pain and inflammation. *AAPS J.*, **11**: 39–44.
- SCHWABE RF, SIEGMUND SV (2005). Potential role of cb2 receptors in cannabis smokers with chronic hepatitis C. *Hepatology*, **42**: 975–6.

- SCHWANHAUSSER B, BUSSE D, LI N, DITTMAR G, SCHUCHHARDT J, WOLF J, CHEN W, SELBACH M (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **473**(7347): 337-42.
- SCHWANHAUSSER B, BUSSE D, LI N, DITTMAR G, SCHUCHHARDT J, WOLF J, CHEN W, SELBACH M (2013). Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **495**(7439): 126-127.
- SHAKOORI AR, ALI SS, SALEEM MA (1988). Effects of six months feeding of cypermethrin on the blood and liver of albino rats. *J Biochem Toxicol.*, **3**: 59-71.
- SHIBAMOTO T, TSUTSUMI M, KUDA Y, OHMUKAI C, ZHANG W, KURATA Y (2012). Mast cells are not involved in the ischemiareperfusion injury in perfused rat liver. *J Surg Res.*, **174**(1): 114-119.
- SIMON LM, LASZLO K, KOTORMAN M, VERTESI A, BAGI K, NEMCSOOK J (1999). Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. environ. Sci. Hlth. B.*, **34**: 819-828.
- SIEGMUND SV, QIAN T, DE MINICIS S, HARVEY-WHITE J, KUNOS G, VINOD KY, HUNGUND B, SCHWABE RF (2007) The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J*, **21**: 2798–806.
- SIEGMUND SV, SEKI E, OSAWA Y, UCHINAMI H, CRAVATT BF, SCHWABE RF (2006) Fatty acid amide hydrolase determines anandamide-induced cell death in the liver. *J Biol Chem*, **281**: 10431–8.
- SIEGMUND SV, UCHINAMI H, OSAWA Y, BRENNER DA, SCHWABE RF (2005). Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology*, **41**: 1085-1095
- SINGH T A, SANTHA P, NAGY I (2005) Inflammatory mediators convert anandamide into a potent activator of the vanilloid type 1 transient receptor potential receptor in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, **136**: 539–548.
- SINGH AK, TIWARI MN, PRAKASH O, SINGH MP (2012). A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal Dopaminergic neurodegeneration. *Curr neuropharmacol*, **10**(1): 64-71.
- SLIPETZ DM, O'NEILL GP, FAVREAU L, DUFRESNE C, GALLANT M, GAREAU Y, GUAY D, LABELLE M, METTERS KM (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Molecular pharmacology*, **48**(2), 352-61.
- STATON PC, HATCHER JP, WALKER D J, MORRISON AD, SHAPLAND EM, HUGHES JP, CHONG E, MANDER PK, GREEN PJ, BILLINTON A, FULLEYLOVE M, LANCASTER HC, SMITH JC, BAILEY LT, WISE A, BROWN AJ, RICHARDSON JC, CHESSELL IP (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, **139**: 225–236.
- SUGIURA T, KONDA S, KISHIMOTO S, MIYASHITA T, NAKANE S, KODAKA T, SUHARA Y, TAKAYAMA H, WAKU K (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not n-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid cb2 receptor. comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in hl-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**(1), 605-12.
- SUN E, XU H, LIU Q, ZHOU J, ZUO P, WANG J (1995). The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol. Trace Elem. Res.*, **48**(3): 231-238

- SUVETHA L, RAMESH M, SARAVANAN M (2010). Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **29**(1): 44-49.
- TAQUET N, DUMONT S, VONESCH JL, HENTSCH D, REIMUND JM, MULLER CD (2009). Differential between protein and mRNA expression of CCR7 and SSTR5 receptors in Crohn's disease patients. *Mediators Inflamm*, **2009**: 1-10.
- TAYLOR ML, METCALFE DD (2001). Mast cells in allergy and host defense. *Allergy Asthma Proc*, **22**(3): 115-119.
- TEIXEIRA-CLERC F, BELOT M, MANIN S, DEVEAUX V, CADOU DAL T, CHOBER T M, LOUVET A, ZIMMER A, TORDJMAN T, MALLAT A, LOTERSZTAJN S (2010). Beneficial praline effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology*, **52**(3): 1046-1050.
- TEIXEIRA-CLERC F, JULIEN B, GRENARD P, TRAN VN, DEVEAUX V, LI L, SERRIERE-LANNEAU V, LEDENT C, MALLAT A, LOTERSZTAJN S (2006) CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med*, **12**: 671-676.
- TIAN Q, STEPANIANTS SB, MAO M, WENG L, FEETHAM MC, DOYLE MJ, YI EC, DAI H, THORSSON V, ENG J, GOODLETT D, BERGER JP, GUNTER B, LINSELEY PS, STOUGHTON RB, AEBERSOLD R, COLLINS SJ, HANLON WA, HOOD LE (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics*, **3**(10): 960-9.
- UNDEĞER, U, BAŞARAN N (2002). Assessment of DNA damage in Workers occupationally exposed to Pesticide Mixtures by the Alkaline Comet Assay. *Arch. Toxicol*, **76**: 430-436.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1989). Pesticide fact sheet number 199: Cypermethrin. Office of pesticides and toxic substances, Washington, DC, p.: 2-9.
- VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ, MOUIHATE A, URBANI P, MACKIE K, STELLA N, MAKRIYANNIS A, PIOMELLI D, DAVISON JS, MARNETT LJ, DI MARZO V, PITTMAN QJ, PATEL KD, SHARKEY KA (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid cb2 receptors. *Science*, **310**: 329-32.
- VANNACCI A, GIANNINI L, PASSANI MB, DI FELICE A, PIERPAOLI S, ZAGLI G, FANTAPPIE O, MAZZANTI R, MASINI E, MANNAIONI PF (2004). The endocannabinoid 2-arachidonylglycerol decreases the immunological activation of guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **311**: 256-264.
- VOGEL C, MARCOTTE EM (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, **13**(4): 227-232.
- WEDEMEYER J, TSAI M, GALLI SJ (2000). Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol*, **12**: 624.
- WHO (1989). Cypermethrin, Environmental Health Criteria 82.
- WHO (1990). The public health impact of pesticides use in agriculture. World Health Organisation, Geneva.
- WOOLANSKY MJ, GENNINGS C, KROFTON KM (2006). Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicol Sci.*, **89**: 271-277.

- WRIGHT CG, LEIDY RB, DUPREE JR HE (1993). Cypermethrin in the ambient air and surfaces of rooms threatened for cockaches. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**: 356-360.
- YANEZ L, ORTIZ D, CALDERON J, BATRES L, CARRIZALES L, MEJIA J (2004). Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environ Health Perspect*, **110**: 901-909.
- YANG M, MA Y, TAO S, DING J, RAO L, JIANG H, LI J (2014). Mast cell degranulation promotes ischemia-reperfusion injury rat liver. *Journal of Surgical Research*, **186**: 170-178.
- YARSAN E, BİLGİLİ A, KANBUR M, ÇELİK S (2002). Effects of deltamethrin on lipid peroxidation in mice. *Veterinary and Human Toxicology*, **44**(2): 73-75.
- YAVAŞOĞLU A, SAYIM F, UYANIKGİL Y, TURGUT M, KARABAY-YAVAŞOĞU NÜ (2006). The Pyrethroid cypermethrin-induced biochemical and histological alterations in rat liver. *Journal of Health Science*. **52**(6): 774-780.
- YOUSSEF MI, AWAD TI, MOHAMED EH (2006). Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rats and its attenuation by Vitamin E. *Toxicol.*, **227**: 240–247.
- ZAIDI SMKR, BANU N (2004). Antioxidant potential of Vitamin A, E ve C in modulating oxidative stress in rat Brain. *Clinica Chimica Acta*, **340**: 229-233
- ZWEIFEL M, BREU K, MATOZAN K, RENNER E, WELLE M, SCHAFFNER T, CLAVIEN PA (2005). Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy. *Immunol Cell Biol.*, **83**: 587–95.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı	Hidayet
Soyadı	TUTUN
Doğum yeri ve tarihi	İzmir, 24/12/1986
Uyruğu	T.C.
Medeni durumu	Bekar
Askerlik durumu	Yaptı
İletişim adresi ve	Şehit Makbule sok. no:50/2, Subay evleri /Ankara
Telefonu	Cep telefonu: 554 266 70 35

Öğrenim Durumu

Lisans	ANKARA ÜNİVERSİTESİ
2005-2010	VETERİNER FAKÜLTESİ

Görevler

ARAŞTIRMA	ANKARA ÜNİVERSİTESİ / VETERİNER FAKÜLTESİ
GÖREVLİSİ	/ KLİNİK ÖNCESİ BİLİMLERİ BÖLÜMÜ /
2012	FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Sıçanlarda Sipermetrin Toksisitesine Bağlı Karaciger Hasarında CB2 Agonisti JWH-133'ün Sagaltıcı Etkisinin Araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Araştırmacı, 2014 (bitti)
2. Antropojenik Kaynaklı Sucul Toksisitenin Belirlenmesinde Alternatif ve Yeni Bir Yaklaşım Olarak PLHC1 ve RTG2 Hücre Hatlarının Kullanılması ve CYP1A1 Biyobelirteci ile Birlikte Değerlendirilmesi, BAP, Araştırmacı, 2013 (Devam Ediyor)

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, TUTUN HİDAYET, SEVIN SEDAT, AYDIN FARAH GÖNÜL (2015). Evaluation of antropogenic ecotoxicity in Ankara River using RTG2 Cell line. JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 38(1), 29-30. (Yayın No: 1685596)
2. ÖZGÜR KUZUKIRAN, YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, FILAZI AYHAN, SEVIN SEDAT, AYDIN FARAH GÖNÜL, TUTUN HİDAYET (2015). A novel method based on ultrasound assisted extraction with low-density solvent and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected polychlorinated biphenyls in marine sediments by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 38(1), 166-166. (Yayın No: 1685565)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1. YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, TUTUN HİDAYET, SEVIN SEDAT, AYDIN FARAH GÖNÜL (2015). Evaluation of antropogenic ecotoxicity in Ankara River using RTG2 Cell line. 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, 38(1), 29-30. (Sözlü Bildiri)(Yayın No:1685774)
2. ÖZGÜR KUZUKIRAN, YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, FILAZI AYHAN, SEVIN SEDAT, AYDIN FARAH GÖNÜL, TUTUN HİDAYET (2015). A novel method based on ultrasound assisted extraction with lowdensity solvent and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected polychlorinated biphenyls in marine sediments by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. 13th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT 2015), 38(1), 166-166. (Sözlü Bildiri)(Yayın No:1685750)
3. KUZUKIRAN ÖZGÜR, YURDAKÖK DIKMEN BEGÜM, FILAZI AYHAN, SEVIN SEDAT, AYDIN FARAH GÖNÜL (2014). Investigation of selected PCBs in water samples from Ankara River by ultrasoundassisted emulsification?microextraction (USAEME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Food Safety:Toxicology from Farm to Fork, Belgian Society of Toxicology and Ecotoxicology (Poster)(Yayın No:1686538)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. TUTUN HİDAYET (2015). Çikolata Zehirlenmesi. MAKÜ sag. Bil. Enst. Derg., 2(2), 114-120. (Kontrol No: 1684886)
2. TUTUN HİDAYET, BAYDAN EMINE (2015). Genetigi Degistirilmis

Organizmaların Toksikolojik Değerlendirmesi. Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi, 15(1-2), 115-125. (Kontrol No: 1684810)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. SEVIN SEDAT, BAYDAN EMINE, TUTUN HİDAYET (2015). Varroa destructor'a Karşı Kullanılan Biyolojik Mücadele Yöntemleri. Ekoloji 2015 Sempozyumu, (Yayın No:1685676)
2. TUTUN HİDAYET, BAYDAN EMINE, SEVIN SEDAT (2015). Genetiği Değiştirilmiş Mısırın Toksikolojik Değerlendirilmesi. Ekoloji 2015 Sempozyumu, (Yayın No:1685662)
3. TUTUN HİDAYET, SEVIN SEDAT, YURDAKÖK DIKMEN BEĞÜM, ALTINTAS LEVENT, AYDIN FARAH GÖNÜL (2013). Bazı Albendazol Preparatlarının Etkin Madde Miktarlarının Belirlenmesi. IV. ULUSAL VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ, (Yayın No:1685697)

Üniversite Dışı Deneyim

2012- Araştırma Görevlisi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi,

2011- Araştırma Görevlisi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi,