

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POLİKLORLU BİFENİLLER VE  
PESTİSİTLERİN İNSAN LENFOSİT  
KÜLTÜRÜNDE İMMÜNOFENOTİP VE  
Th1/Th2 POLARİZASYONUNA ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Gökçen ÖZDEMİR**

**2014**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

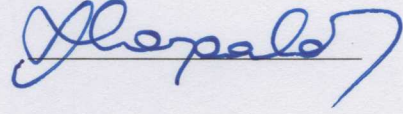


Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

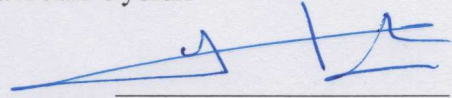
Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



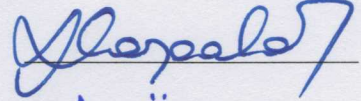
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

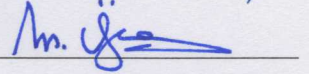
Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR



Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Doç. Dr. Mete ÖZCAN



.....

\_\_\_\_\_

.....

\_\_\_\_\_

*Annem Babam*  
*ve en kymmetli varligum*  
*kurum Berfin'e*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime uzun bir aradan sonra geri dönmeme ve tezimin hazırlanmasında sınırsız sabır, yardım, bilgisini, desteğini esirgemeyen ve kendime olan inancımı hiçbir zaman yitirmemem gerektiğini öğreten değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT' a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR' a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm, istatistiğin o karışık dünyasında sayıların yan yana daha anlamlı olduğunu öğreten Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mete ÖZCAN' a, beni her gördüğünde "tez nasıl gidiyor?" sorusuyla tez gerçeğini bana asla unutturmayan ve sayıların grafikte nasıl hayat bulduğunu gösteren Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU' na teşekkür ederim.

Fizyoloji dünyasının kapılarını bana aralayan, bu ekibin bir parçası olma fırsatını veren ve başarılarıyla kendime hep örnek alacağım Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bayram YILMAZ ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Süleyman SANDAL' a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmamızda her türlü desteği veren, tecrübesinden yararlandığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. N. Fulya İLHAN' a ve Yıldırım Beyazıt Tıp Fakültesi Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasının her basamağında manevi desteklerini esirgemeyen ve enerjimin düşmesine asla izin vermeyen Araştırma Görevlileri Nazife ÜLKER ve Ahmet YARDIMCI' ya, Fizyoloji doktora öğrencisi Özgür BULMUŞ' a sonsuz teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman hissettiğim Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK, Yrd. Doç. Dr. Emine KAÇAR, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ULAŞ' a, Araştırma Görevlileri Sermin ALGÜL ve Zübeyde ERCAN' a teşekkür ederim.

Ve son olarak her şart ve koşulda hep yanımda olan, hayatta hep dik durmayı öğreten babam Ruhi ÖZDEMİR ve annem Feride ÖZDEMİR' e, benim her duygu durumumu anlayan canım ablam Gök Nur KERTİ ve abim Gök tuğ ÖZDEMİR' e ve var olma nedenim biricik yavrum Berfin' ime sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>1. ÖZET.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>3. GİRİŞ.....</b>	<b>5</b>
3.1.    Poliklorlu bifeniller.....	5
3.2.    İnsandaki PCB seviyeleri.....	6
3.3.    Pestisitler.....	8
3.3.1.  Endosulfan.....	11
3.3.2.  Kloropirifos.....	12
3.4.    Poliklorlu bifenillerin ve pestisitlerin immün sistem üzerine etkileri.....	13
3.5.    Lökositler (Akyuvarlar).....	14
3.6.    Lenfositler (İmmünositler).....	16
3.7.    Sitokinler ve immünofenotip belirteçleri.....	18
<b>4. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>22</b>
4.1.    Deneyde kullanılan denekler.....	22
4.2.    Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	22
4.3.    Numunelerin alınması.....	23
4.4.    Deney protokolleri.....	23
4.4.1.  Flow sitometri analizleri.....	23
4.4.1.1. Periferik kandan lenfosit izolasyonu.....	23
4.4.1.2. Hücre kültürü hazırlanması.....	25
4.4.1.3. Flow sitometri.....	26
4.4.2.  ELISA protokolü.....	29
4.4.2.1. ELISA çalışma prensibi.....	29
4.4.2.2. IL-13, TGF- $\beta$ ve INF- $\gamma$ seviyelerinin belirlenmesi.....	30

4.5.	İstatistiksel değerlendirme.....	32
<b>5.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
5.1.	IL-13 sonuçları.....	33
5.1.1.	PCB 52' nin IL-13 seviyeleri üzerine etkisi.....	33
5.1.2.	PCB 77' nin IL-13 seviyeleri üzerine etkisi.....	35
5.1.3.	Endosulfam IL-13 seviyeleri üzerine etkisi.....	37
5.1.4.	Kloropirifosun IL-13 seviyeleri üzerine etkisi.....	38
5.2.	INF- $\gamma$ sonuçları.....	40
5.2.1.	PCB 52' nin INF- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi.....	40
5.2.2.	PCB 77' nin INF- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi.....	42
5.2.3.	Endosulfamın INF- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi.....	44
5.2.4.	Kloropirifosun INF- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi.....	46
5.3.	TGF- $\beta$ sonuçları.....	48
5.3.1.	PCB 52' nin TGF- $\beta$ seviyeleri üzerine etkisi.....	48
5.3.2.	PCB 77' nin TGF- $\beta$ seviyeleri üzerine etkisi.....	50
5.3.3.	Endosulfamın TGF- $\beta$ seviyeleri üzerine etkisi.....	52
5.3.4.	Kloropirifosun TGF- $\beta$ seviyeleri üzerine etkisi.....	54
5.4.	CD değerleri.....	56
5.4.1.	Poliklorlu bifenillerin CD değerleri üzerine etkileri.....	56
5.4.2.	Pestisitlerin CD değerleri üzerine etkileri.....	57
5.4.3.	Poliklorlu bifenillerin doz bağımlı CD değerleri üzerine etkileri.....	58
5.4.4.	Pestisitlerin doz bağımlı CD değerleri üzerine etkileri.....	59
<b>6.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>75</b>

## TABLO LİSTESİ

- Tablo 3.1:** Ankara bölgesinde yaşayan kadınlardan alınan süt ve yağ dokusu örneklerindeki PCB bileşenlerinin seviyeleri (ng/g lipit ağırlığı)..... 7
- Tablo 3.2:** Altı farklı ülke ile Türkiye' deki (Ankara) insanların yağ dokusu örneklerindeki bazı PCB bileşenlerinin seviyeleri (ng/g lipit aralığı)..... 7
- Tablo 5.1:** PCB 52 ve PCB 77' nin uygulamasını takiben 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin CD seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....57
- Tablo 5.2:** Kloropirifos ve endosulfanın uygulamasını takiben 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin CD seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....58
- Tablo 5.3:** PCB 52 ve PCB 77 'nin lenfosit hücreleri ile muamele edildikten 48 saat sonra doza bağımlı olarak CD seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....59
- Tablo 5.4:** Kloropirifos ve endosulfanın lenfosit hücreleri ile muamele edildikten 48 saat sonra doza bağımlı olarak CD seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....60

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 3.1:</b>	PCB' lerin kimyasal yapısı.....	6
<b>Şekil 3.2:</b>	Doğadaki pestisitlerin dönüşümleri.....	9
<b>Şekil 3.3:</b>	İçerdikleri etkin maddelerin özelliklerine göre pestisit türler.....	10
<b>Şekil 3.4:</b>	Lökosit formülü.....	15
<b>Şekil 3.5:</b>	Lökosit tipleri.....	16
<b>Şekil 3.6:</b>	Lenfosit mikroskopik görünümü.....	17
<b>Şekil 3.7:</b>	Lenfosit oluşumu.....	18
<b>Şekil 4.1:</b>	Dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre ayrımı.....	24
<b>Şekil 4.2:</b>	Analiz için sınırlandırılan (gated) alanda nispeten homojen olan canlı hücre topluluğu görülmektedir.....	27
<b>Şekil 5.1:</b>	PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	33
<b>Şekil 5.2:</b>	10 µg/mL KonA varlığında PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	34
<b>Şekil 5.3:</b>	PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	35
<b>Şekil 5.4:</b>	10 µg/mL KonA varlığında PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	36



- Şekil 5.5:** Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....37
- Şekil 5.6:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum ile yapılan analizlerde endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....38
- Şekil 5.7:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....39
- Şekil 5.8:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....40
- Şekil 5.9:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN-γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....41
- Şekil 5.10:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN-γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....42
- Şekil 5.11:** PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN-γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....43
- Şekil 5.12:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum ile yapılan analizlerde PCB 77' ni uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre

lenfosit hücrelerindeki IFN- $\gamma$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	44
<b>Şekil 5.13:</b> Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	45
<b>Şekil 5.14:</b> 10 $\mu$ g/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	46
<b>Şekil 5.15:</b> Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	47
<b>Şekil 5.16:</b> 10 $\mu$ g/mL KonA varlığında kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	48
<b>Şekil 5.17:</b> PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	49
<b>Şekil 5.18:</b> 10 $\mu$ g/mL KonA varlığında PCB 52' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	50
<b>Şekil 5.19:</b> PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....	51

- Şekil 5.20:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, PCB 77' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerindeki TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....52
- Şekil 5.21:** Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....53
- Şekil 5.22:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....54
- Şekil 5.23:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.....55
- Şekil 5.24:** 10 µg/mL KonA varlığında kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler..... 56

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>Ah</b>	:	Aryl hidrokarbon
<b>CD</b>	:	Cluster of Differentiation
<b>DDT</b>	:	Dikloro Difenil Triklorethan
<b>DMSO</b>	:	Dimetil Sülfid Oksit
<b>EDTA</b>	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>ELISA</b>	:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>FACS</b>	:	Flow Sitometri Analizi
<b>FCS</b>	:	Fötal Buzağı Serumu (New Bron Calf Serum)
<b>HEPES</b>	:	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
<b>IFN</b>	:	İnterferon
<b>IL</b>	:	İnterlökin
<b>KonA</b>	:	Konkanavalin A
<b>MCH</b>	:	Major Histokompatibilite Kompleksi
<b>NK</b>	:	Doğal Öldürücü (Natural Killer)
<b>PCB</b>	:	Poliklorlu Bifenil (Polychlorinated Biphenyl)
<b>TCDD</b>	:	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
<b>TcR</b>	:	T hücresi Reseptörü
<b>Th</b>	:	Yardımcı T (T helper)
<b>TNF</b>	:	Tümör Nekrosis Faktör
<b>Treg</b>	:	T regülatör

## 1. ÖZET

Pestisitler tarımda zararlılarla savaşmak, poliklorlu bifeniller (PCB' ler) ise endüstriyel kullanım amacıyla üretilmişlerdir. PCB ve pestisitlerin biyoakümülatif özellikte oldukları bilinmektedir. Bu bileşenlerin nörotoksik, kanserojenik, immün sistem baskılayıcı ve endokrin bozucu etkileri olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, PCB 52, PCB 77, endosulfan ve kloropirifosun insan lenfosit hücre kültüründe; Th1/Th2 polarizasyonuna ve immüno fenotip üzerine olan etkilerini incelemektir.

Bu çalışmada, izole edilen insan lenfositleri 8 gönüllünün venöz kan örneklerinden hazırlandı. Kan örnekleri alınarak lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi ve hücre kültür plaklarına aynı yoğunlukta ekim yapıldı. Hazırlanan dört ayrı lenfosit hücre kültürüne sırasıyla PCB 52 (0.1µl), PCB 77 (1µl), endosulfan (1µl) ve kloropirifos (10µl) uygulandı. Bu deneyler konkanavalinA (KonA) içeren ve içermeyen medyumda ayrı ayrı tekrar edildi. PCB ve pestisit uygulamasından sonra 24 ve 48 saatin sonunda 0.3 mL supernatant alındı. ELISA yöntemiyle IL-13, IFN-γ ve TGF-β seviyelerindeki değişiklikler tespit edildi. Deneylerin sonunda tüm kuyucuklardaki lenfositler tekrar besi ile muamele edildi ve yüzey immüno fenotip yüzey belirteçleri flow sitometri ile belirlendi.

PCB' ler Th1 ve B hücrelerinde CD23, CD4+25 ve TGF-β ekspresyonu seviyelerinde anlamlı bir artışa sebep oldu. Pestisitlerin özellikle de kloropirifosun lenfosit hücre kültüründe CD4+CD30 seviyesinde artışa sebep oldu. Th2 polarizasyonunu baskılayıcı etkisi gözlemlendi.

Sonuçlarımız, PCB'lerin immün cevabı Th1 yönünde, pestisitlerin ise Th2 yönünde değiştirebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Poliklorlu bifeniller, Pestisitler, Th1/Th2 polarizasyonu, immünofenotip, insan lenfosit kültürü.

## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND PESTICIDES ON IMMUNOPHENOTYPE AND Th1/Th2 POLARISATION IN HUMAN LYMPHOCYTE CULTURES**

Pesticides were being produced against pestilents in agriculture sector, while polichlorinated bipheyls (PCBs) were produced for industrial purposes. PCBs and pesticides have been to have known bioaccumulative properties. It was shown that, PCBs and pesticides have neurotoxicity, carcinogenicity, immune system suppression and endocrine disruption effects in various studies. The aim of this thesis study was to investigate the action of PCB 52, PCB 77 and endosulphan, chlorpyrifos on Th1/Th2 polarization and immuno phenotype in human lymphocytes cultures.

In this study, isolated human lymphocytes were prepared from venous blood sample from eight volunteers. And then lymphocyte isolation was performed and plantation having same density was made to the cellular culture plates. PCB 52 (0,1  $\mu$ l), PCB 77 (1  $\mu$ l), endosulphan (1  $\mu$ l) and chloropirifus (10  $\mu$ l) were applied to four different lymphocyte cellular culture, respectively. The experiments was done separately both with and without Concanavalin A (ConA) medium. Supernatant with 0,3 mL was taken in the end of 24 and 48 hours after application PCBs and pesticides. And then we measured in levels of IL-13, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  by ELISA method. At the end of these experiment, lymphocytes in all well plate were applied by repeatitive feeding and immuno phenotype was detected by flow cytometry.

PCBs caused a significant increase in expression of CD23, CD4+25 and TGF- $\beta$  on Th1 and B cells. Pesticides, especially chlorpirifus, caused an increase in levels of CD4+CD30+ at lymphocytes cell cultures. Chlorpirifu caused increase in level of IFN- $\gamma$  while suppression effects in Th2 polarization.

Our results showed that PCBs and pesticides may lead to change immune system response towards Th1 and Th2, respectively.

**Key Words:** Polychlorinated biphenyls (PCBs) , pesticides, Th1/Th2 polarization, immunophenotype, human lymphocyte culture.

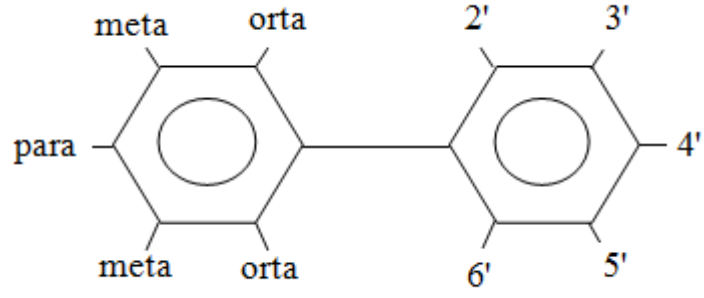


## 3. GİRİŞ

### 3.1. Poliklorlu bifeniller

Endüstriyel kullanım amacıyla (elektrik trafoları, pompalar, matbaacılık, mürekkep, boya sanayi v.s.) poliklorlu bifeniller (PCB) 1940' lı yıllarda üretilmeye başlanmıştır (1). Kalıcı ve lipofilik özellikleri (persistent organic pollutants) nedeniyle büyük oranda çevreyi kirlettiğinden (2), 1970' li yıllarda başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere birçok ülkede yasaklanmış ve bazı ülkelerde de kullanımını sınırlandırılmıştır (3). Günümüzde halen birçok ülkede PCB içerikli teçhizat ve sanayi ürünleri kullanılmaktadır (4). Birçok ülkenin ve Türkiye'nin de aralarında bulunduğu yaygın PCB kontaminasyon alanları bulunmaktadır (5).

Bu çevre kirletici ajanların besin zincirine girerek, insan dâhil yeryüzündeki her canlıya taşındığı bildirilmiştir (6). Solunum yolu henüz tam olarak kabul görmemekle birlikte canlılar vücutlarına doğada bulunan PCB' leri temas ederek veya yedikleri besinler yoluyla alırlar (7). PCB' lere maruz kalmanın yaklaşık %95' nin besin yoluyla ve bunun da %90' dan fazlasının özellikle de kontamine olmuş sularda yaşayan balıkların tüketimiyle olduğu bildirilmiştir (8). PCB' ler bir fenil halkası üzerine 1 ile 10 farklı sayılar ve konumlarda (*orto-*, *meta-* ve *para-*) klor molekülünün bağlanmasıyla oluşan aromatik bileşiklerdir (Şekil 3.1) (9).



**Şekil 3.1:** PCB' lerin kimyasal yapısı

### 3.2. İnsandaki PCB seviyeleri

PCB bileşenleri doğada uzun yıllar boyunca kalıcı olma özelliği olan bileşenlerdir (10). İnsan sağlığı üzerine toksik etkileri olduğu bilinmekte ancak bu etkilerin hangi dokularda var olduğunun tespit edilmesi daha önemlidir. Bu bileşenlerin insan yağ dokusu, idrar, serum ve süt numunelerinde mevcut olduğunu rapor eden farklı çalışmalar bulunmaktadır (11-13). Amerika' da yapılan 12 farklı çalışmada spesifik olarak herhangi bir PCB uygulamasına maruz kalmayan toplam 4889 insanda ortalama serum PCB değerlerinin 3.88 µg/L ile 15 µg/L arasında olduğu ancak, bu çalışma grubunda ki bazı bireylerin serum seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir (7). Yağ dokuları ve süt numunelerinde, PCB bileşeninin varlığını tespit için Çok ve arkadaşlarının iki farklı çalışmasında Ankara bölgesinde yaşayan kadınlarda araştırma yapmışlardır ve yedi farklı PCB olduğunu tespit etmişlerdir (14, 15) ( Tablo 3.1).

<b>DOKU/PCB</b>	<b>28</b>	<b>52</b>	<b>101</b>	<b>118</b>	<b>138</b>	<b>153</b>	<b>180</b>	<b>TOPLAM</b>	<b>REF</b>
<i>Süt Numuneleri</i>	5.7	10.3	6.6	18.9	54.3	110.0	59.8	265.6	<b>50.0</b>
<i>Yağ Dokusu</i>	5.0	11.4	10.4	40.7	82.3	141.7	91.8	383.3	<b>51.0</b>

**Tablo 3.1:** Ankara bölgesinde yaşayan kadınlardan alınan süt ve yağ dokusu örneklerindeki PCB bileşenlerinin seviyeleri (ng/g lipit ağırlığı).

Yedi değişik ülkenin ve Türkiye'nin de içinde yer aldığı PCB bileşenlerinin bölgelere göre, seviyelerinde farklılıklar gösterebileceği Tablo 3.2' de ortaya koyulmaktadır.

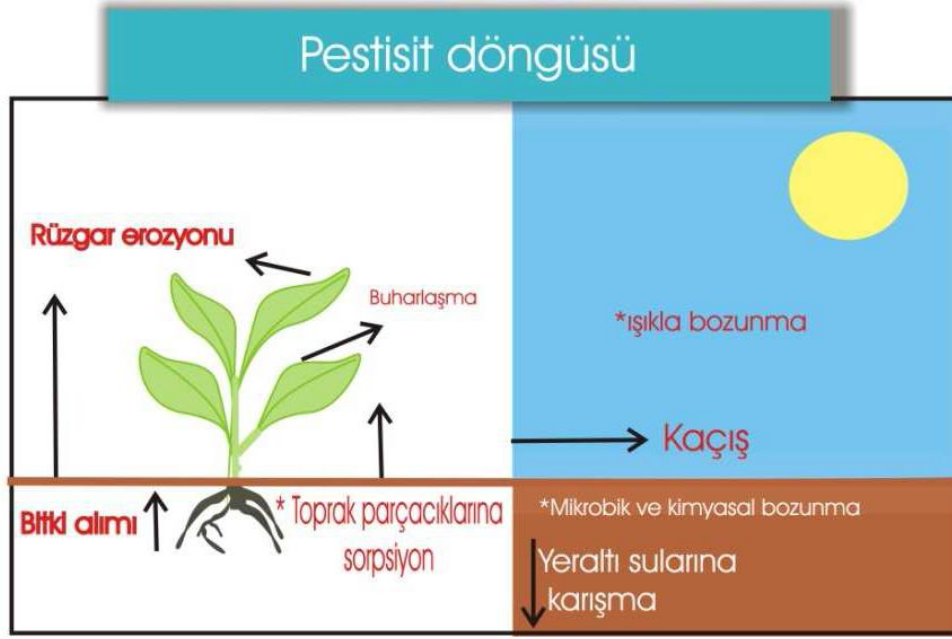
<b>ÜLKE/PCB</b>	<b>28</b>	<b>52</b>	<b>101</b>	<b>118</b>	<b>138</b>	<b>153</b>	<b>180</b>	<b>REF</b>
<i>Polonya</i> 1994 (n=20)	13	1.7	4.2	71.0	230.0	290.0	195.0	74
<i>Belçika</i> 2000 (n=46)	2.8	2.7	3.0	57.1	68.3	145.3	93.7	174
<i>İtalya</i> 2000(n=10)	*	*	3.0	20.7	58.0	112.0	85.5	148
<i>İspanya</i> 2000 (n=35)	4.9	0.9	2.0	47.0	220.0	300.0	280.0	258
<i>İsveç</i> 2000 (n=28)	4.1	1.4	2.3	40.0	230.0	300.0	200.0	258
<i>Şili</i> 2000 (n=10)	*	*	*	3.2	6.2	11.0	7.8	148
<i>Türkiye</i> 2001 (n=29)	5.0	11.4	10.4	40.7	82.3	141.7	91.8	51

**Tablo 3.2:** Altı farklı ülke ile Türkiye' deki (Ankara) insanların yağ dokusu örneklerindeki bazı PCB bileşenlerinin seviyeleri (ng/g lipit aralığı).

Tablo 3.2' den de anlaşılacağı gibi ölçülen PCB seviyelerinin birbirinden farklı olması bölgesel farklılıklarla birlikte başka etkilere de bağlıdır. PCB konsantrasyonlarında yaş ile doku arasında kuvvetli bir bağ vardır fakat cinsiyet ile benzer bir durum söz konusu olmadığı bildirilmiştir (16). Kontamine yiyecek tüketiminin azalmasına bağlı olarak insan dokularındaki PCB bileşenlerinin konsantrasyonlarının da zamana bağımlı bir şekilde azaldığı fakat bu azalmanın her PCB bileşeni için de geçerli olmadığı belirtilmiştir (17).

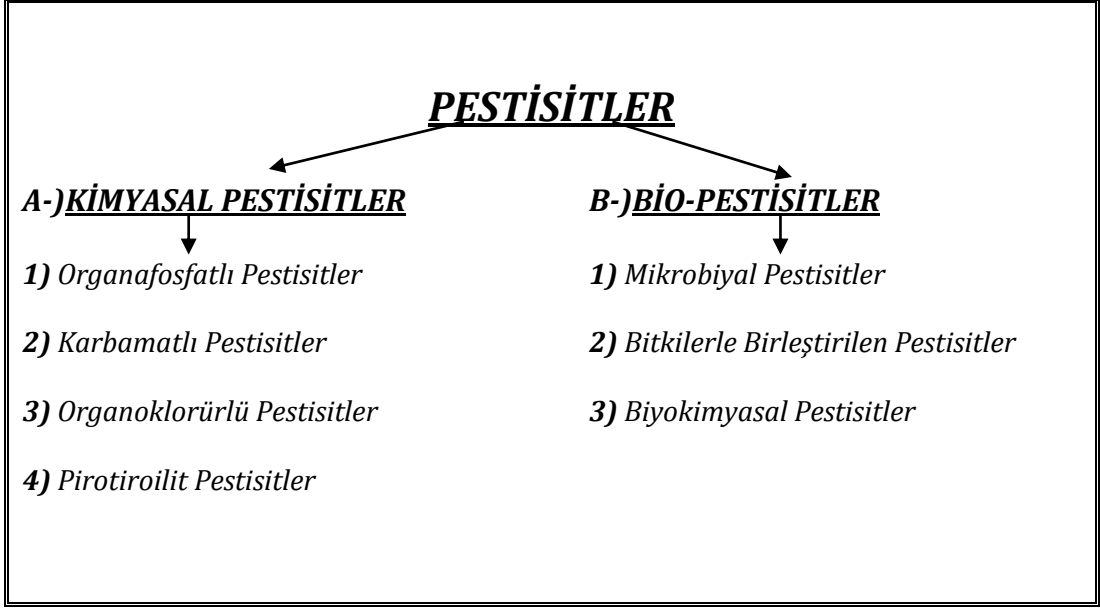
### **3.3. Pestisitler**

Doğada; insan, bitki veya hayvanlara zarar veren varlıkların etkilerini azaltmak, önlemek ya da ortadan kaldırmak amacı ile kullanılan kimyasal madde karışımlarına "*pestisit*" denir (18). Pestisitlerin zararlı organizmalara karşı hızlı ve yüksek etkinlikte sonuç vermelerinden ayrıca kontrollü kullanıldıklarında ekonomik olmalarından dolayı yaygın bir kullanımı söz konusudur (19). Pestisitler ekonomik açıdan büyük bir öneme sahiptirler bundan dolayı gerek dünyada gerekse ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, bir bitkiye verildiklerinde sadece o bitki yüzeyinde ya da yapısında kalmaz farklı yollarla doğaya yayılabilirler. Pestisitler özelliklerine göre, buharlaşarak rüzgârla taşınabilir, yağmurlarla yer altı sularına ya da yüzey sularına karışarak sadece uygulandığı bölgeye değil, bu yollarla çok daha uzak mesafelere taşınabilirler (20) (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2:** Doğadaki pestisitlerin dönüşümleri (EXTOXNET web sayfasından uyarlanmıştır (20)).

Pestisitler içerdikleri aktif maddelere göre kimyasal pestisitler ve biyo-pestisitler olarak iki gruba incelenmektedir (Şekil 3.3). Bunlardan kimyasal pestisitler, zararlıları engellemeye ya da öldürmeye yönelik olan kimyasal maddeleri içerirler. Şekil 3.3’ de görüldüğü gibi kimyasal pestisitler de kendi içinde dört ayrı gruba ayrılmışlardır. Bu gruplardan biri de karbamat pestisitlerdir. Asetilkolin enziminin bozulmasına yol açarak sinir sistemini etkileyen karbamat pestisitlerin de birkaç alt grubu vardır ve bu gruplara göre fungusit ya da insektisit olarak kullanılmaktadırlar. Bu gruplardan biri de hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde yaygın olarak kullanılan bir fungusit grubu olan ditiyokarbamat pestisitleridir (21, 22).



**Şekil 3.3:** İçerdikleri etkin maddelerin özelliklerine göre pestisit türleri.

Son 30 yıl boyunca *diklora difenil trikloroethan* (DDT) başta olmak üzere *lindan*, *endosulfan*, *aldrin*, *metoksiklor* ve *heptaklor* gibi birçok pestisitün üretim ve kullanımı yasaklanmıştır (23). Buna rağmen, bu bileşiklere çevredeki kalıcılıkları nedeniyle günümüzde insan ve hayvanların çeşitli dokularında rastlanmaktadır (24). Bir tarım ülkesi olan ülkemizde de pestisitler yaygın olarak kullanılmış ve birçok tarım alanı, nehir, göl ve deniz tonlarca madde ile kirletilmiştir (25). Bu nedenle ve biyoakümülyasyon faktörü de göz önüne alındığında, bu bileşiklerin halen ülkemizde maruz kalınan kimyasalların başında yer aldığı görülmektedir (26, 27). DDT ve benzeri pestisitlerin yasaklanmış olmasına rağmen, günümüzde halen stoklarda olduğu ve bilinçsiz ve/veya kaçak olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir (28). Delen ve arkadaşları tarafından sunulan raporda 2006-2008 yılları arasında en fazla satılan pestisitler ditiyokarbamat pestisitlerinden *mankozep*, *tiram* ve *piropinebin* olarak

açıklanmıştır (41). Bu kimyasal kirleticilerin yeraltı sularına bulaşma riski olduğu bildirilmiştir (29).

### **3.3.1. Endosulfan**

Endosulfan organoklor yapısında bir pestisit olup doğada ve canlı organizmada birikme eğilimi gösterir (30). Türkiye’de de yakın yıllara kadar yoğun şekilde kullanıldığı ve çevreyi kirlettiği bilinmektedir (31). Endosulfanın immünotoksik etkilerini inceleyen literatürdeki ilk çalışmada, erkek sıçanlara farklı dozlarda (5, 10 ve 20 ppm) ve sürelerde (8-22 hafta) uygulamanın hücrel immüniteyi (lökosit göç inhibisyonu ve monosit göç inhibisyonu) ve antikor üretimini baskıladığı (IgM ve IgG) gösterilmiştir (32). Ancak, yine erkek sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada endosulfanın tek başına lenfosit, monosit ve total lökosit sayısını değiştirmedeği, ancak başka pestisitlerle (Carbaryl gibi) kombinasyon halinde verildiğinde bu parametrelerde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (33). Endosulfan içeren bir karışımın (*Hekzaklorobenzen*, *DDT*, *PCB*, *mireks*, *heptaklor*, *aldrin* ve *dieldrin* ile birlikte) immün fonksiyonlar üzerine etkileri erkek ratlarda incelenmiş ve doğal öldürücü (Naturel Killer (NK)) hücre aktivitesi ile lenfosit proliferasyonunun önemli şekilde baskılandığı belirlenmiştir (33). Endosulfanın *in vitro* ortamda lenfositler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (35). Bu immünotoksik etkiler koyun lenfositlerinde de “lökosit göç inhibisyon metodu” kullanılarak gösterilmiştir (36). Balık hücrelerinde flow sitometre metodu ve FITC floresan boyası kullanılarak yapılan bir çalışmada ise endosulfanın fagositik aktiviteyi azalttığı görülmüştür (37). Sıçanlardan primer olarak hazırlanan peritoneal makrofaj hücre kültürlerinde

endosulfan, tümör nekrosis faktör (TNF- $\alpha$ ) serbestlemesini anlamlı şekilde baskılamıştır (38). Yeni bir çalışmada, endosulfanın insan böbrek kanser hücre kültüründe östrojen reseptörü aracılığıyla sitokin sinyal iletisini etkileyebileceği gösterilmiştir (39). Endosulfanın östrojenik etkiye sahip bir endokrin bozucu olduğu bildirilmiştir (40).

### **3.3.2. Kloropirifos**

Kloropirifos organofosfat yapısında geniş spektrumlu bir pestisitir. Kloropirifosun ülkemizde çok yaygın olarak kullanıldığı ve bioakümülatif özellik gösterdiği bilinmektedir (41). Organofosfatlı bileşikler biyokimyasal olarak çok stabil değildir. Organizmada biyolojik aktivite (enzim inhibisyonu) gösterebilmeleri için desülfürasyon yönünde metabolik aktivasyona uğramaları gerekir. Organofosfatlı pestisitler primer olarak asetilkolin esteraz enzimini inhibe ederek nörotoksik etki gösterirler (42). Akut intoksikasyon olgularında maruz kalınan pestisitlerin dozuna ve giriş yoluna bağlı olarak çeşitli muskarinik ve nikotinik semptomlar görülür ki ağır durumlarda epileptik kriz (seizure) ve solunum yetersizliğinden ölüm görülür. Asetilkolin esteraz inhibisyonunun yanı sıra, serin hidrolaz içeren enzimler bu pestisitlerin hedefi olabilir. Serin hidrolaz içeren enzimler ise immün sistemde önemli rol oynarlar. Organofosfatlı pestisitlerin immünotoksik etkileri Galloway ve Handy tarafından değerlendirilmiştir (42). Yapılan farklı bir çalışmada ise bir ay süreyle oral gavajla (5 mg/kg, haftada iki kez) kloropirifos uygulanan sıçanlarda konkanavalinA (KonA) ile indüklenmiş T lenfosit blastojenezisi bozulmuş, CD5+ ve CD8+ taşıyan lenfositlerin oranı artmış, ancak makrofajların fagositik aktivitesinde



değişiklik meydana gelmemiştir (43). Kronik olarak kloropirifosa maruz kalan ve sağlık sorunları yaşayan 29 kişilik bir kohort periferal lenfosit fenotipleri, otoantikor üretimi ve mitojenezis yönünden araştırılmıştır. Bu olgularda yaş ve cinsiyet farkı olmaksızın, CD5+ fenotipinde azalma, CD28+ fenotipinde artma, KonA ile indüklenmiş mitojeneziste azalma ve otoantikor üretiminde artış belirlenmiştir (44). Aynı araştırma grubunun daha önce yayınladığı iki olguda da CD26+ immünofenotipinin yükseldiği ve düz kas, tiroid bezi, miyelin ve paryetal hücrelere karşı otoantikorların arttığı gözlenmiştir (45). Neonatal dönemde kloropirifosa maruziyetin erişkinlikte immün sistemde önemli fonksiyon bozukluklarına sebep olabileceği ileri sürülmüştür (46). Ancak, kloropirifosun sitokin salınım profili ve genel immünotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır.

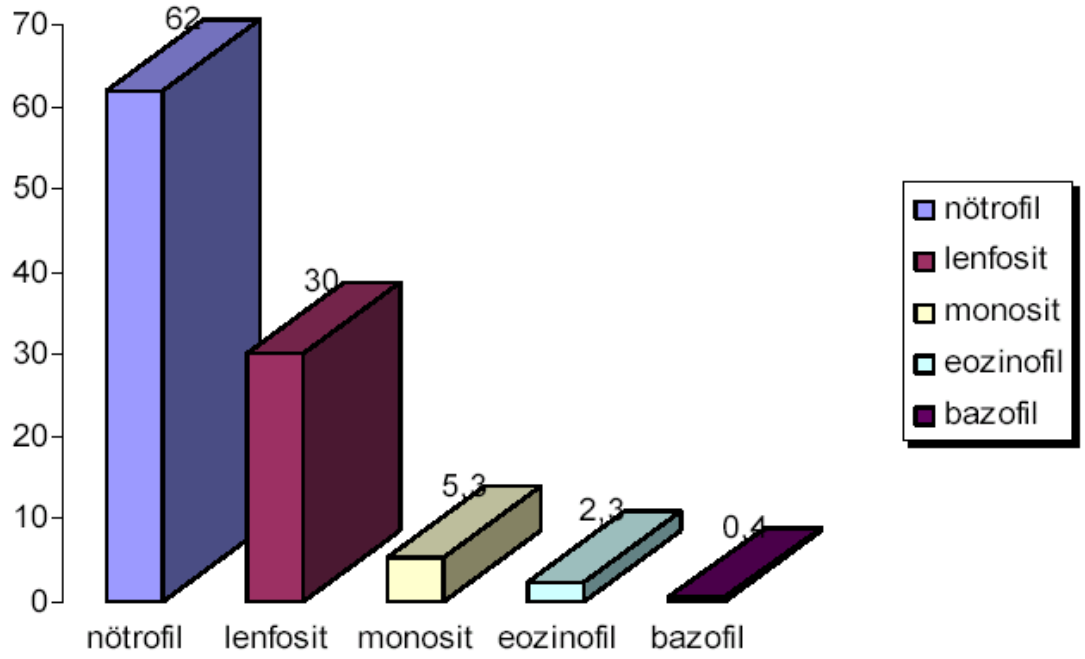
#### **3.4. Poliklorlu bifenillerin ve pestisitlerin immün sistem üzerine etkileri**

PCB'lerin ve pestisitlerin immün parametreleri etkilediği bilinmektedir. Bu kirletici ajanların humoral ve hücrel immünite üzerine etkilerinin olduğu hem insanlarda hemde farklı hayvan türlerinde gösterilmiştir (47-49). T lenfositlerin PCB' lere *in vivo* maruz kalınması lenfositlerin aktivitesini ve antikor üretimini azaltarak immün fonksiyonları zayıflattığı bildirilmiştir (50, 51). Yine insanlarda ve hayvanlarda, PCB' lerin immün baskılama ve timik atrofiye sebep olduğu gösterilmiştir (52). Pestisitlerin yüksek konsantrasyonlarının insan NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir ve vücuda girdiğinde NK hücrelerinin 24 saatten kısa bir sürede işlevlerini yerine getirdiği gözlenmiştir (53).

PCB toksitesi üzerine çalışma yapan araştırmacıların genel olarak odaklandıkları nokta, *Aryl hidrokarbon* (Ah) reseptörünün aktivasyonu ve sitokrom P450' e bağlı mono oksijenazların indüksiyonu yoluyla gösterilen *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin* (TCDD) benzeri (immün baskılayıcı ve kanserojenik) etkilerdir (54, 55). Bu etkilerin, PCB bileşenlerinin sadece *meta* ve *para* pozisyonlarına bağlı bulunan klorlar yüzünden olduğu düşünölmektedir. PCB' ler tarafından meydana getirilen immün baskılayıcı etkinin, tür, ırk, cinsiyet ve yaşı bağlı olduğu bildirilmiştir (56).

### **3.5. Lökositler (Akyuvarlar)**

Kan korpüskülleri veya akyuvarlar da denilen lökositler çekirdekli kan hücreleridir. Beş ayrı tipi bulunduğundan görevleri de çok çeşitlidir. Bir birim mm<sup>3</sup> kanda ortalama 7000 lökosit bulunur. Sayıları dört binin altına düşerse "lökopeni", sayıları on binin üstüne çıkarsa "lökositoz" adı verilir. Bu lökosit sayısını oluşturan beş lökosit tipinin yüzde oranı " lökosit formülü" olup, birçok hastalığın tanımına yardımcı olur (24) (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4:** L6kosit form6l6

L6kositler n6kleusların tek veya par6alı oluŐuna ve sitoplazmada 6zel gran6l bulunup bulunmamasına g6re beş tipe ayrılmıŐtır. Bu sınıflamaya g6re:

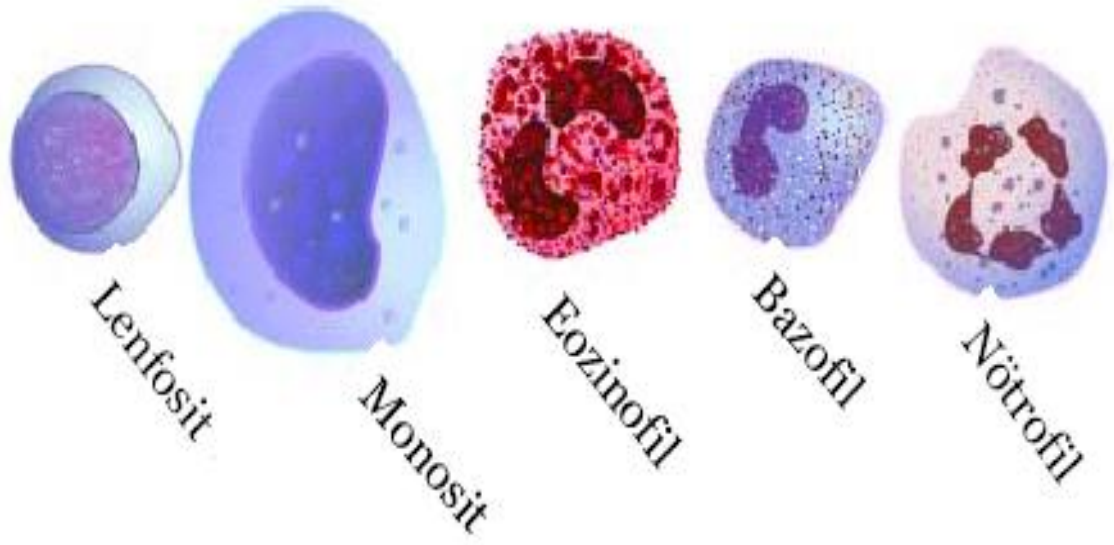
A) Gran6lositler:

- a. N6trofiller
- b. Eozinofiller
- c. Bazofiller

B) Agran6lositler:

- a. Monositler
- b. Lenfositler

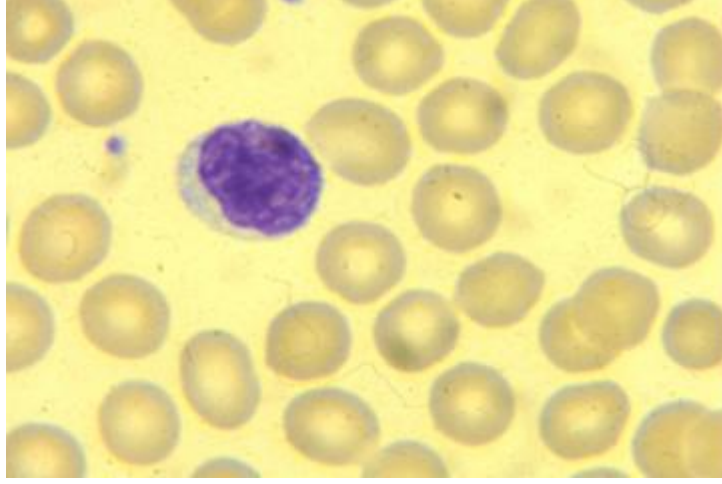
olmak 6zere beş tipe ayrılırlar (Şekil-3.5).



**Şekil 3.5:** Lökosit tipleri

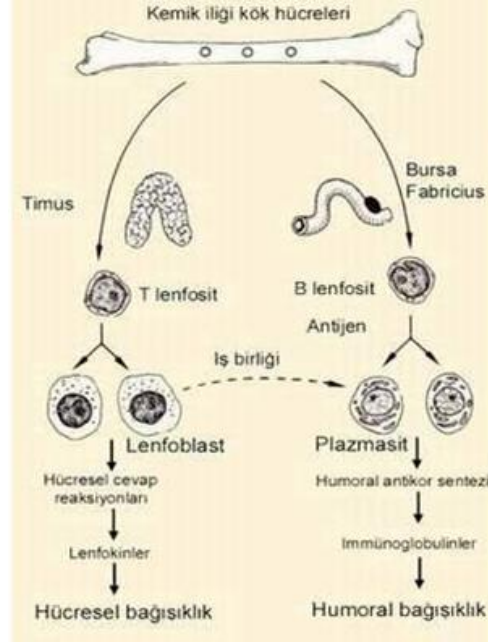
### **3.6. Lenfositler (İmmünoisitler)**

Çapları 9-12  $\mu\text{m}$  olan, spesifik immüniteden sorumlu hücrelerdir. Giemsa ile boyandığında koyu kromatin yapısına sahip, büyük ve yuvarlak bir nükleus ile onu çeviren gök mavisi dar bir sitoplazma şeridinden oluşurlar (Şekil-3.6). İnsan vücudunda total 100 milyon kadar lenfosit bulunduğu ve her gün yaklaşık 2 milyon yeni T hücresinin ve 20 milyon yeni B hücresinin yapıldığı hesaplanmıştır. Vücuttaki total lenfosit sayısının %2 kadarını periferik kan lenfositleri oluşturur (57).



**Şekil 3.6:** Lenfosit mikroskopik görünümü (59)

Lenfosit klonları, santral lenfoid dokuları oluşturan fetal karaciğer, kemik iliği ve timusta iki ayrı doğrultuda primer (fonksiyonel) farklılaşmaya uğrarlar. Kuşlarda, son barsaktaki kloakada yer almış bir lenfoid organ olan *Bursa of Fabricius*'a bağımlı gelişme göstererek humoral immüniteyi oluşturan lenfositlere B lenfositleri; timusa bağımlı gelişme göstererek sellüler (hücreye dayalı) immüniteyi oluşturan lenfositlere de T lenfositleri denmektedir (57) (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7:** Lenfosit oluşumu (58)

### 3.7. Sitokinler ve immünofenotip belirteçleri

T helper (Th) alt grup hücreleri heterojen bir popülasyona sahip olup kandaki lenfositlerin %35-60 kadarını oluştururlar. Th2 alt grubundaki lenfositler IgE dahil olmak üzere, antikor üretiminde etkin olarak rol oynarlar ve eozinofiliyi uyarırlar. Th1 alt grubundaki lenfositler ise, özellikle opsonizan antikor yapımına katkıda bulunmakla birlikte, esas olarak sitolitik aktivite işlevi görürler (59). Th1 alt grubundaki hücrelerin %77' si sitolitik aktivite gösterirler. Buna karşılık, Th2 alt grubundaki hücrelerin ancak %18' inde sitolitik etkinlik görülür. Bu özellikleri göz önünde tutulduğunda Th1 klonlarının hücresel immün yanıtta; Th2 klonlarının ise esas itibarıyla humoral immün yanıtın ortaya çıkmasında aktif rol oynadıkları görülmektedir (60).

İmmün sistem, antijenin şekline göre (hücre içi veya hücre dışı) hücresele (Th1 tipi) veya humoral (Th2 tipi) ağırlıklı cevap hazırlar. Th hücrelerinin sitokin profiline göre, Th1 (tip 1) ve Th2 (tip 2) subsetlerine ayrılması çeşitli hastalıklar ile sitokinler arasındaki ilişkilerin anlaşılmasını kolaylaştırır. Th1 hücreleri; IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  serbestleyerek hücresele immüniteyi stimüle ederler ve viral, bakteriyel, fungal, protozoal enfeksiyonlara karşı mücadele ederler. Th2 hücreleri ise başlıca IL-4, IL-5 ve IL-10 salgılayarak humoral immüniteyi uyarırlar (60, 61). Th1/Th2 polarizasyonu bazı doğrudan ve feed-back aracılı mekanizmalarla düzenlenir. Th1 yanıtı Th2 yolunu iki şekilde engeller: IFN- $\gamma$  ve IL-12, Th2 oluşumunu inhibe eder, IFN- $\gamma$  aynı zamanda B hücrelerinde antikor sınıf çevrimini engeller, diğer taraftan, IFN- $\gamma$  kendisini üreten Th1 hücre yanıtını bir süre sonra durdurur. Aynı şekilde, Th2 yanıtı da Th1 yolunu inhibe eder (62).

Uyarılmış CD4+ T hücreler Th0, Th1, Th2 ve Th3 olmak üzere alt gruplarda sınıflandırılırlar. Bu alt sınıfların salgıladıkları sitokin profilleri birbirinden farklıdır. Bu farklı sitokinlerin etkisi ile alt sınıf hücreler fonksiyonel olarak da birbirinden farklılık göstermektedir (63). Th0 hücreler özellikle insanlarda birçok CD4+ T hücre, Th1 ve Th2 arasında bir sitokin profiline sahiptir ve bu hücreler INF- $\gamma$  ve IL-4 üretebilme özelliğine sahiptirler (64). Th1 hücreler gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtının ve makrofaj aktivasyonunun oluşmasında, Th2 hücreler antikor sentezinden ve özellikle IgE izotip çevriminden sorumlu tutulmaktadır (63). Th3 alt grubunun ise immün sistemin genel kontrol sitokini olan TGF- $\beta$ 'yı ürettiği bilinmektedir (60, 65).

Normal veya patolojik durumlarda olası Th1 veya Th2 baskın cevabının belirlenmesi, ciddi metabolik problemler nedeniyle sınırlıdır. T lenfosit hücreleri

tarafından üretilen sitokinlerin çoğu az miktarlardadır ve bunların bir kısmı mikro çevreye salınmaz, hücre-hücre kontaktı sırasında bir hücreden diğerine direkt olarak transfer edilir. Bu nedenle, gerçekte büyük ölçüde biyolojik sıvılardaki spontan sitokin sekresyonları veya T hücre süpernatantlarındaki ölçüm veya tespit major olarak imkansızdır. T hücre bağımlı efektör cevapların sitokin profilini karakterize etmek için farklı metodolojik yaklaşımlar uygulanmaktadır. Son zamanlarda bazı yüzey belirteçlerinin bulunması sonucu Th1-Th2 hücreleri ile ilişkili olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. T hücrelerinde yüzey immünoglobülinleri bulunmaz. Antijenik peptidlerin tanınması T hücre reseptörü (TcR) ile gerçekleşir (68). İnsan T hücreleri CD4 ve CD8 farklılaşma markerleri dışında başlıca CD2, CD3, CD5, CD7, CD28, CD98, CD99, CD100 yüzey markerlerini ve Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) klas-I antijenlerini üretirler. Ayrıca CD45' in, hücrenin aktivasyon durumuna göre değişen izoformlarını üretirler. CD45, bir lökosit markeri olup TcR uyarımı için tirozin fosfataz etkinliği gösterir. CD45RA+ izoformu naif; CD45RO+ izoformu ise bellek aktivasyon durumunda olan T hücrelerinde üretilirler. MHC klas-II antijenleri sadece aktive T hücrelerinde üretilirler. Bundan başka, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 gibi çeşitli sitokinler T hücre gelişmesine yardımcı olurlar (67). CD30 aktive Th2 ve CD26 ise aktive olmuş Th1 hücreleri üzerinden eksprese edilir (59, 68).



## **AMAÇ**

Bu çalışma, Türkiye’de yaygın olarak kullanılan ve doğada uzun süre kalma potansiyeline sahip organoklorlu (endosulfan) ve organofosfatlı (kloropirifos) pestisitler ile PCB’lerin insan lenfosit kültürlerinde Th1/Th2 polarizasyonu ve immünofenotip (CD yüzey belirteçleri) üzerine etkilerini araştırmak amacıyla planlandı.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Deneyde kullanılan denekler

Bu çalışmada, 18 – 20 yaşlarında sekiz (8) sağlıklı, aynı kan grubu (0 Rh<sup>+</sup>) erkek gönüllülerden alınan kan örnekleri üzerinde gerçekleştirildi. Sigara, alkol veya diğer bağımlılık yapıcı madde veya herhangi bir ilaç kullanımı, herhangi bir metabolik veya kronik hastalık, tonsillektomi ve splenektomi gibi cerrahi operasyon ve allerji gibi immün sistem bozuklukları bulunan denekler çalışmaya dahil edilmedi. Denekler çalışma konusunda bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı.

### 4.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitleler

PCB 52 ve 77, endosulfan, kloropirifos, L-Glutami N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) ihtiva eden RPMI-1640 ve New Born Calf Serum (FCS), Biological Industries (İsrail), Penicillin/Streptomycin Mediatech Collegro (VA, AK, HI, ABD), IFN- $\gamma$ , IL-13 ve TGF- $\beta$  Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kitleleri de BioSource Internatiol,Inc.' den (Camarillo, California ABD) sağlandı. Kullanılan diğer tüm kimyasallar Sigma Chemical Co.( St. Louis, MO, ABD)' dan sağlandı.

PCB' ler, endosulfan ve kloropirifos dimetil sülfid oksit (DMSO)' da çözüldü. DMSO' nun konsantrasyonu hiçbir deneyde %0.2' den fazla olmadı ve tüm deney protokollerinde PCB' ler, endosulfan, kloropirifos ve kontrol grubu ile beraber DMSO' nun analizi yapıldı.

### **4.3. Numunelerin alınması**

Gönüllü bireyler sabah saat 08:00 - 09:00 arasında Fırat Tıp Merkezi İmmünoloji laboratuvarına davet edildi ve kan örnekleri (toplamda 10 mL) alındı.

- 2 mL' si EDTA 'lı tüplere flow sitometrik yöntemle immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için alındı.
- 8 mL' si kuru tüplere “Dansite Gradient Santrifüj” yöntemiyle lenfosit izolasyonu için alındı.

### **4.4. Deney protokolleri**

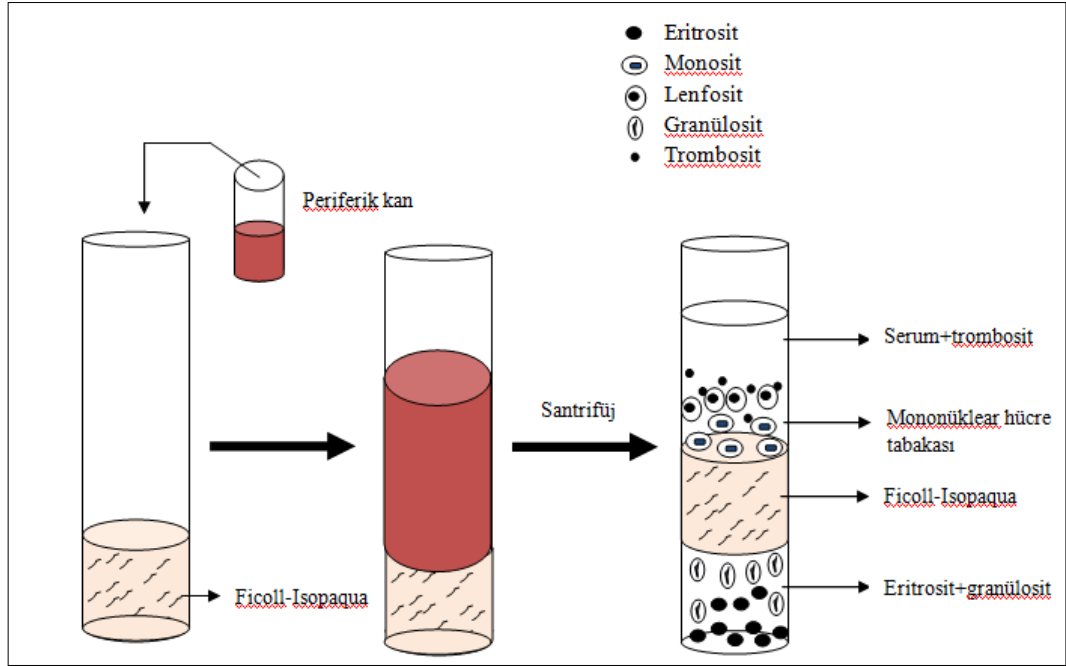
Hücre canlılığı (viability) ve immünofenotip (CD yüzey belirteçleri) seviyelerinin belirlenmesi için flow sitometri, sitokin tayinleri için de ELISA olmak üzere iki ayrı deney protokolü uygulandı.

#### **4.4.1. Flow sitometri analizleri**

##### **4.4.1.1. Periferik kandan lenfosit izolasyonu**

Heparinize periferik kandan lenfosit veya lenfosit alt gruplarının ayrımı için değişik yöntemler uygulanabilmektedir. Örneğin Flow sitometri analiz (FACS) cihazı ile lenfosit yüzey antijenlerine özgül monoklonal antikorlar, lenfosit yüzey antijenlerine özgül antikor ile kaplı magnetik boncuklar veya eritrosit rozet formasyonu gibi değişik yöntemler kullanılarak lenfosit veya lenfosit alt grupları ayrıştırılabilir.

Ancak dansite-gradient santrifüj yöntemi en kolay olan yöntemdir (Şekil 4.1). Dansite gradient yönteminin temeli kan hücre gruplarının birbirinden farklı dansite özelliğinin bulunmasına dayanır.



**Şekil 4.1:** Dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre ayırımı

Dansite gradient santrifüj yönteminde ;

- İzolasyon için 15 mL' lik konik tabanlı steril test tüpleri (Cellstar PP test tubes Greiner Labortechnic) alındı,
- Hücre ayırıcı solüsyon olarak Ficoll-isopaque (dansitesi 1077 gr/Lt) Solution kullanıldı,
- Steril tüplere, kültür kabini içinde 2 mL ayırıcı solüsyon ve yine yaklaşık 2-2.5 mL kan eklendi,
- Çökmesi beklendikten sonra 1800 devirde Hettich Universal 32 santrifüj cihazı kullanılarak 30 dakika 24<sup>0</sup>C' de santrifüj edildi,
- Santrifüj sonrası Şekil 4.1' deki gibi tabaklanma gözlemlendi. Eritrosit ve granülositlerin dansitesi 1.077' den daha fazla olduğu için Ficoll-isopaque içerisinde geçerek tüpün dibine çöktü,

- Mononükleer hücrelerin (lenfositlerin) dansitesi 1.077 'den daha düşük olduğu için Ficoll-isopaque üzerinde kaldı,
- Ficoll-isopaque üzerinde yüzen tabaka (buffy coat) steril pastör pipeti ile dikkatlice toplandı ve düşük devirde yıkandı böylece trombosit kontaminasyonu azaltıldı.
- Yıkanmış mononükleer hücreler plastik petri kabında 60 dakika bekletilerek monositlerin zemine yapışması sağlandı.
- Böylece monositlerin plastiğe yapışma özelliği kullanılarak monositleri uzaklaştırılmış ve lenfositler elde edilmiş oldu.

#### **4.4.1.2. Hücre kültürü hazırlanması**

- Hücreleri yıkamak ve kültüre etmek için komplet medium hazırlandı.
- Bunun için L-glutaminli RPMI 1640 solüsyonuna, %10 oranında %3' lük inaktive fetal calf serumu (Sigma-Aldrich Germany) eklendi ve 2 mM L-Glutamine (yoksa), 20 mM HEPES (yoksa), %10 FCS, %1 Penicillin/streptomycin dikkatli bir şekilde tritürasyonu yapıldı.
- Hücreler, komplet medium ile yıkandı.
- Bunun için, 400 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve pelletin üzerindeki sıvı kısım atılarak yıkama işlemi tekrarlandı ve pellet karıştırıldı.
- Hücre sayımı için 20 µl ½ sulandırılmış tripan blue kullanıldı.
- Hücreler Thoma lamında sayıldı ve her hücre süspansiyonunda yaklaşık  $10^7$  hücre olacak şekilde ayarlandı.
- Hücre süspansiyonu 24 kuyucuklu steril doku kültür plaklarına aktarıldı.

- Hazırlanan hücre kültürleri 37<sup>0</sup>C’ de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde saklandı ve yaşatıldı.
- Hücrelerin canlılık oranı (cell viability) tripan blue kullanılarak kontrol edildi ve optimum şartlar sağlanınca testlere başlandı.

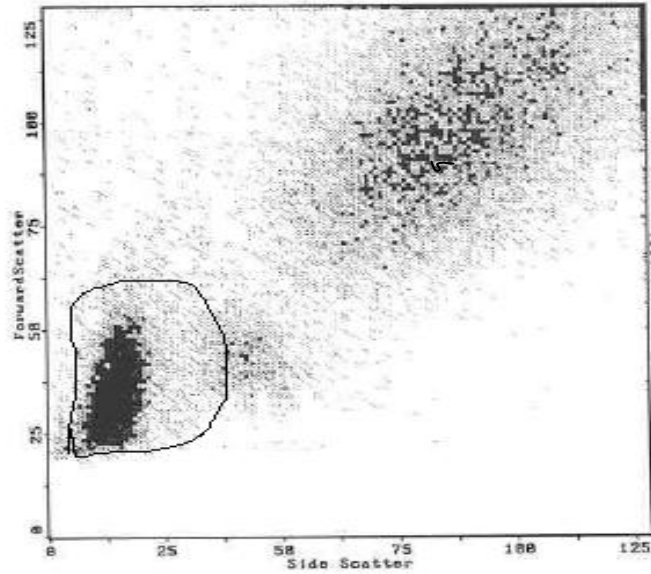
Buna göre; test edilecek PCB bileşikleri (52 ve 77) (0.1 ve 1 µl) ve pestisitler (endosulfan ve kloropirifos) (1 ve 10 µl) iki farklı dozda uygulandı. Deneyle KonA (pozitif kontrol) içeren ve içermeyen medyumda ayrı ayrı tekrar edildi. Test ajanlarının, hücre besi yerlerine uygulanmasından sonra hücreler 48 saat süreyle Heraeus marka (Hera Cell, Almanya) %5 CO<sub>2</sub> , %95 hava inkübatöründe inkübe edildi. Uygulamalar başladıktan sonra, 24.ve 48. saatlerde süpernatantlardan 0.3 mL alındı ve sitokin ölçümleri için -20<sup>0</sup>C’ de saklandı.

Deneyle sonunda tüm kuyucuklardaki hücre süspansiyonları ayrı ayrı santrifüj edilerek lenfositler ayrıştırıldı, tekrar besi ile muamele edilerek, yüzey CD belirteçleri flow sitometri ile tayini yapılmak için hazırlandı.

#### **4.4.1.3. Flow sitometri**

Flow sitometrede temel prensip, lazer ışınının önünden hücrelerin bir taşıyıcı vasıtasıyla tek tek geçmelerini sağlamak ve bu esnada da kullanılan prob/probların emisyon floresanın görüntülenmesi esasına dayanır. Bu şekilde hücrelerin morfolojileri hakkında bilgi elde edilebilir. Bu bilgi lazer ışını lazer saçıcılar (scatter) tarafından sağlanır. Flow sitometride, ileri doğru (forward) ve yan (side) olmak üzere iki farklı lazer ışın saçıcı vardır. İleri doğru ışın saçıcı hücrelerin büyüklükleri, yan ışın saçıcı ise hücrelerin granül yapısı hakkında bilgi sağlar. Nispeten homojen olarak belirli bir alanda görülen hücre toplulukları

analizler için sınırlandırıldı (Şekil 4.2). Burada amaç, hem morfolojik hem de büyüklük olarak birbirlerine en yakın olan hücrelerden sonuç elde etmektir. Hücreler, özellikleri bilinen (dalga boyları biri birinden farklı) floresan proplarla uygun şekilde muamele edilirse aynı anda birden fazla sonuç elde etmek mümkün olabilmektedir.



**Şekil 4.2:** Analiz için sınırlandırılan (gated) alanda nispeten homojen olan canlı hücre topluluğu görülmektedir.

Analizlere başlamadan önce Flow sitometri cihazının kalibrasyon işlemleri yapıldı.

- Test prosedürüne uygun olarak her tüpe 5 µl monoklonal antikor ve 100 µl kan eklendi.
- Tüpler 1-2 dakika orta şiddette vortekslendi.
- Bu aşamadan sonra floresans kaybı olmaması için tüpler 20 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında (25<sup>0</sup>C) bekletildi.

- Tüplerin işleme hazır olması için gerekli yıkama ve karıştırma işlemlerini TQ prep cihazı ile otomatik olarak yapıldı.
- Cihazın gerekli voltaj ayarları yapılarak tüpler Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter) cihazı kullanılarak flow sitometrik olarak incelendi ve Expo-32 analiz programı kullanılarak aynı cihaz da analiz edildi.
- Flow sitometride lenfosit hücre (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD25, CD26, CD30, CD45, CD56) oranları hesaplandı. Bunun için floresanla (FITC veya PE) işaretli monoklonal antikorlar (Coulter Immunotech, France) kullanılarak Coulter EPICS XL-MCL cihazında analiz yapıldı.
- EDTA' lı tüp içerisindeki periferik kan örneğinden, tam kan lizis yöntemiyle eritrositler uzaklaştırıldı. Sonrasında da her tüp için uygun çerçeve (gate) içerisinde 5000 hücre sayıldı ve analizleri yapıldı. Her bir monoklonal antikorla reaksiyon veren lenfositler, floresan özelliklerine göre ayrılıp sayıları yüzde olarak elde edildi.

#### CD Yüzey Belirteçleri:

- CD3 tüm T lenfositlerde bulunan belirteçtir,
- CD4 Th hücre belirteci,
- CD8 Tc hücre belirteci,
- CD45 ve CD14 lökosit ve monosit işaretleyicileridir,
- CD19 B lenfosit işaretleyicisidir,
- CD16+56 NK işaretleyicisidir,
- CD30 Th2 polarizasyonu gösterir,



- CD4+25 T regülator hücre belirteci,
- CD4+26 Th1 polarizasyonunu gösterir.

#### **4.4.2. ELISA protokolü**

##### **4.4.2.1. ELISA çalışma prensibi**

ELISA yöntemi özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. Antijen ve antikor bağlanması özgül olduğu için ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarını ölçebiliriz (69).

Çalışmamızda indirekt mikro ELISA yöntemi kullanıldı. Bu metot ile INF- $\gamma$  (Th1 polarizasyonunu gösteren sitokin), IL-13 (Th2 polarizasyonunu gösteren sitokin) ve TGF- $\beta$  (Th3 subgrubu sitokin) düzeyleri belirlenecektir.

Bu yöntemde:

- 96 kuyucuklu, düz tabanlı polistren plaklar kullanılacaktır.
- Antijen kaplı kuyucuklara örneklerimizden belirli bir miktarda bırakılır ve oda ısısında (25<sup>0</sup>C) veya 37<sup>0</sup>C' de belirli bir süre bekletilir. İnkübasyon sonunda kuyucuklara eklenmiş olan örneklerimiz dökülür ve kuyucuklar tamponlanmış sıvı ile yıkanır. Burada eklediğimiz örnekler içerisinde özgül antikor var ise plaktaki antijene bağlanır ve yıkama işleminde ortamdaki uzaklaşmaz. Ama eklediğimiz örnekler içerisinde özgül antikor yok ise plaktaki antijene bağlanmaz ve yıkama işleminde ortamdaki uzaklaşır.

- Plaklardaki antijenlere bağlanan antikorları işaretlemek için yine kuyucuklara belirli bir miktarda enzim konjugat bırakılır ve inkübe edilir. İnkübasyon sonunda kuyucuklara eklenmiş olan enzim konjugat aspire edilir ve kuyucuklar tamponlanmış sıvı ile yıkanır.
- İkinci yıkama işlemi sonrasında ortama bağlı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla kuyucuklara konjugattaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir. Kuyucuklara eklenmiş olan renksiz enzim substratı belirli bir süre sonrasında konjugattaki enzimin etkisiyle renklenir.
- Enzimin aktivitesini durdurmak amacıyla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (stop solüsyonu) eklenir ve oluşan rengin koyuluğu (optik dansitesi) ELISA okuyucusunda uygun filtre kullanılarak değerlendirilir.

#### **4.4.2.2. IL-13, TGF-β ve INF-γ seviyelerinin belirlenmesi**

IL-13, TGF-β ve INF-γ ELISA analizleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Analizlere başlamadan önce numuneler(-20<sup>0</sup>C) ve ELISA kitinin (Color Reagents hariç) (4<sup>0</sup>C) oda ısısına gelmesi beklendi.

#### **REAJANLARIN HAZIRLANMASI:**

- A. Human (IL-13, TGF-β ve INF-γ) Antibody, üzerine 3.5mL Assay Diluent ilave edildi ve vortekslendi.
- B. Recombinant ( IL-13, TGF-β ve INF-γ) Standartları seri dilüsyon ile hazırlamak için önce 5 ve 6 adet deney tüpü hazırlandı ve tüplerin içerisine Assay Diluent aynı miktarda bırakıldı.Daha sonra hedef standart değerleri;

- IL-13 için, 500, 125, 31.25, 7.81 ve 0.0 (pg/mL)
- TGF- $\beta$  için, 4000, 1000, 250, 62.5 ve 0.0 (pg/mL)
- INF- $\gamma$  içinde, 1000, 250, 125, 62.5, 15.6 ve 0.0 (pg/mL) olacak şekilde depo stoktan belirli bir miktar alındı ve seri dilüsyon yapılarak standartlar hazırlandı.

C. Diluent Wash Buffer, 1000 mL dH<sub>2</sub>O ilave edilip iyice karıştırıldı.

D. Goat Anti-Human Conjugated Alkali Phosphatase, 6 mL Assay Diluent ilave edilip vortekslendi.

E. Color Reagents bir falcon tüpü içerisine boşaltılıp vortekslendi (hazırlandıktan sonra iki saat içerisinde kullanılması gerektiği için daha sonra hazırlandı).

Örnekler çözülüp oda ısısına geldikten sonra aşağıda anlatılan çalışma aşamasına geçildi.

1. Seri dilüsyon ile hazırlanan standartlar, en yüksek standarttan başlanarak Pre-coated 96-Well Plate'in kuyucuklarına sırasıyla 100  $\mu$ l konuldu.
2. Belirlenmiş bir sırayla diğer kuyucuklara da numunelerden 100  $\mu$ l aktarıldı.
3. Plate, Asetat plate kaplayıcı ile kaplandı ve 37 °C'de 1 saat bekletildi.
4. Hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile ELP 40 marka otomatik bir plate yıkayıcısında (BIO-TEC Instruments, Inc., Vermont, ABD) 1x4 kez yıkama yapıldı.
5. Tüm kuyucuklara 100  $\mu$ l Biotin Conjugated Alkaline Phosphatase ilave edildi.

6. Plate Asetat plate kaplayıcı ile kaplandı ve oda ısısında 1 saat bekletildi.
7. 4. basamakta anlatılan yıkama işlemleri tekrarlandı.
8. Tüm kuyucuklara Streptavidin-HRP'den 100 µl ilave edilip 30dk. oda ısısında beklendi.
9. 4. basamakta anlatılan yıkama işlemleri tekrarlandı.
10. Tüm kuyucuklara Stabilized' den 100 µl ilave edilip 30dk. oda ısısında beklendi.
11. Her kuyucuğa 50 µl Stop solüsyonu eklendi.
12. Plate, ELX 800 Universal marka bir plate okuyucuda (BIO-TEC Instruments, Inc., Vermont, ABD) uygun program seçilerek 450 nm dalga boyunda okutuldu.

Çalışma prosedürü esnasındaki bekleme süreleri karanlıkta gerçekleştirildi.

#### **4.5. İstatistiksel değerlendirme**

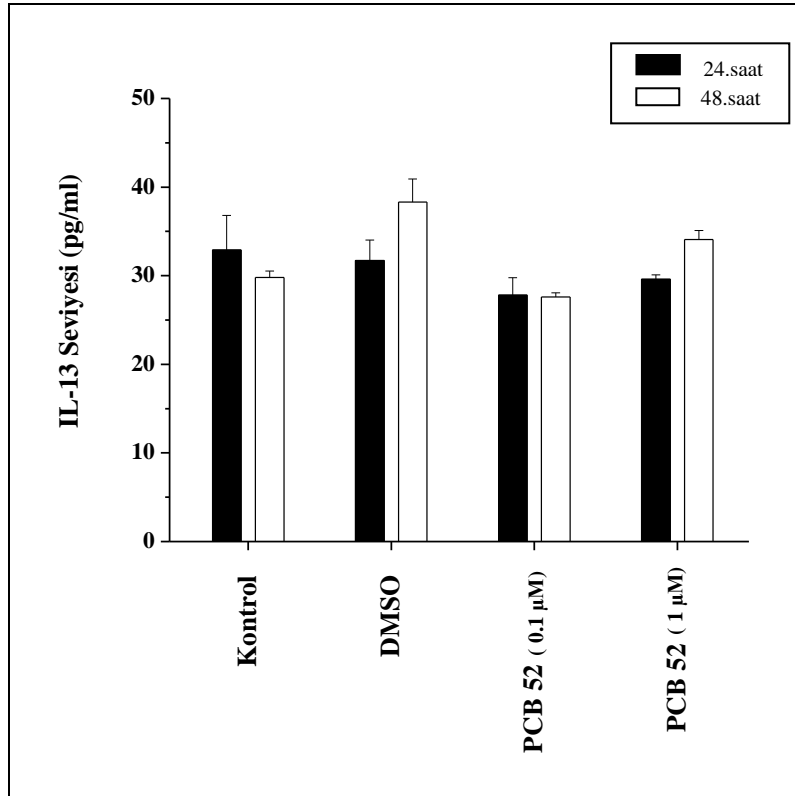
Araştırmadan elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesi SPSS 16.0 for Windows Programında yapıldı. Tüm sonuçlar Ortalama  $\pm$  SH olarak gösterildi. IL-13, TGF- $\beta$  ve INF- $\gamma$  sitokin bulguları Tek Yönlü Varyans Analizi uygulandıktan sonra Post Hoc Tukey Test ile analiz edildi. İmmünofenotip (CD yüzey belirteç) yüzde değerler ise Ki-Kare Test ile analiz edildi.  $p \leq 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 5. BULGULAR

### 5.1. IL-13 sonuçları

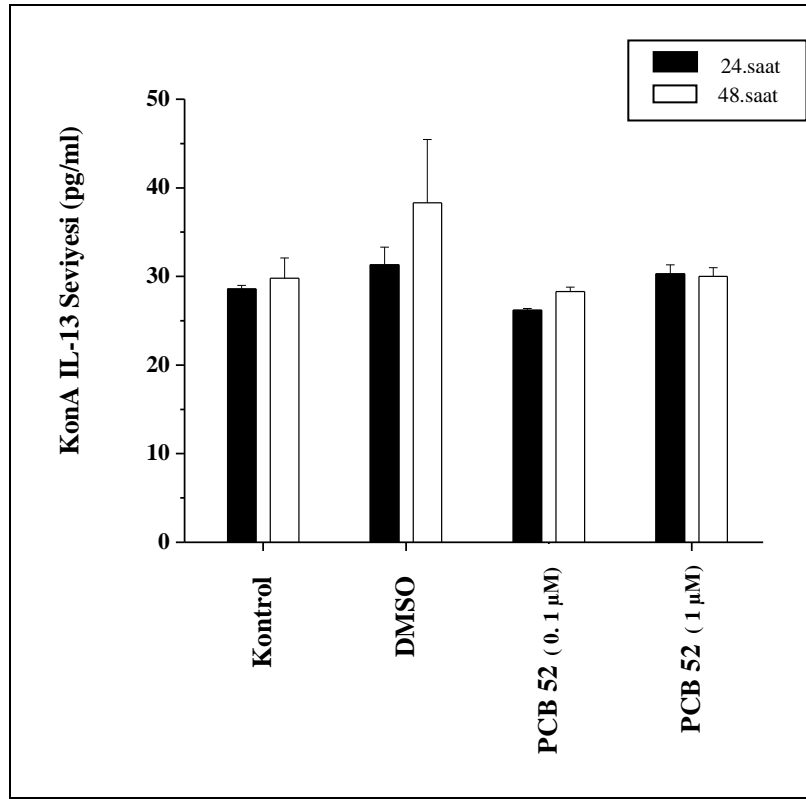
#### 5.1.1. PCB 52' nin IL-13 seviyeleri üzerine etkisi

Lenfosit hücreleri, 0.1 ve 1  $\mu$ M PCB 52 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.1' de gösterildi. PCB 52' nin 0.1 ve 1  $\mu$ M' lık konsantrasyonu, IL-13 seviyesinde hem 24 hem de 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.



**Şekil 5.1:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler ( $p<0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

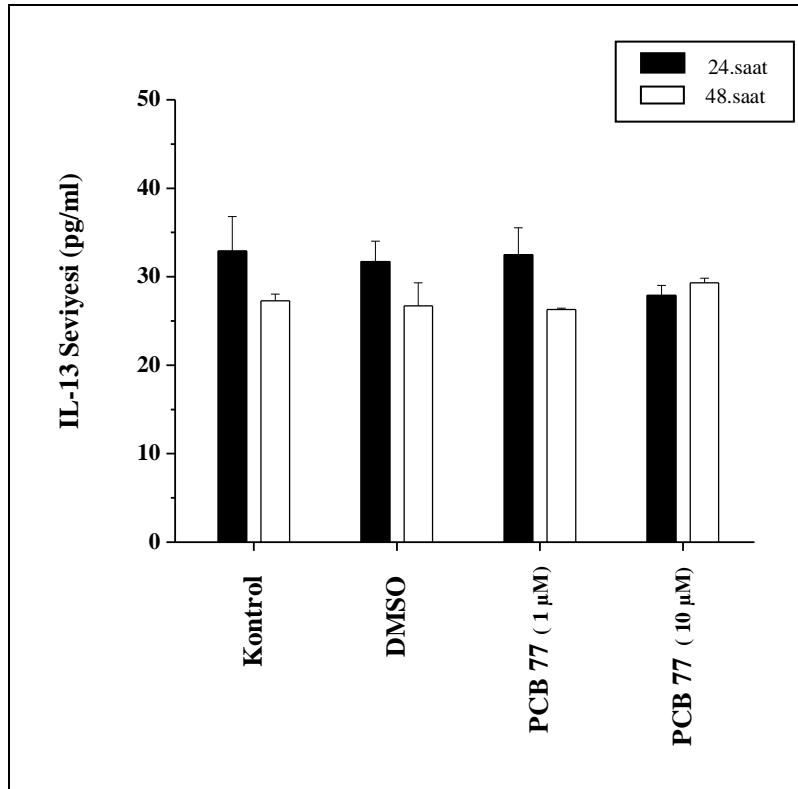
10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, 0.1 ve 1 µM PCB 52 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra IL-13 seviyelerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2:** 10 µg/mL KonA varlığında PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler ( $p<0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

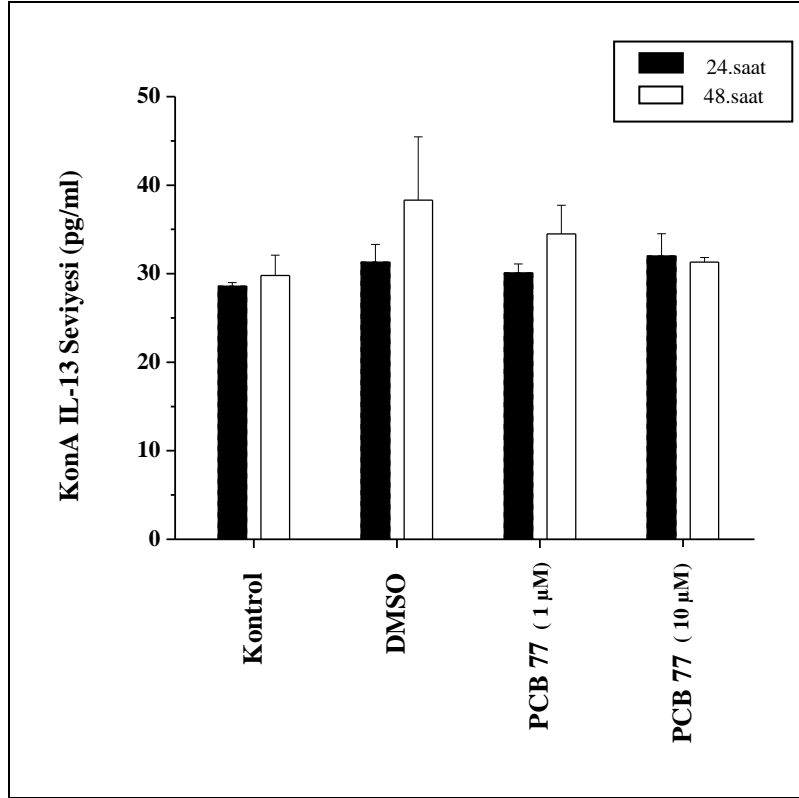
### 5.1.2. PCB 77' nin IL-13 seviyeleri üzerine etkisi

Lenfosit hücreleri PCB 77 ile 1 ve 10  $\mu$ M muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.3' de gösterildi. PCB 77' nin 1 ve 10  $\mu$ M' lık konsantrasyonu, IL-13 seviyesinde 24 ve 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.



**Şekil 5.3:** PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, 1 ve 10 µM PCB 77 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IL-13 seviyelerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.4).

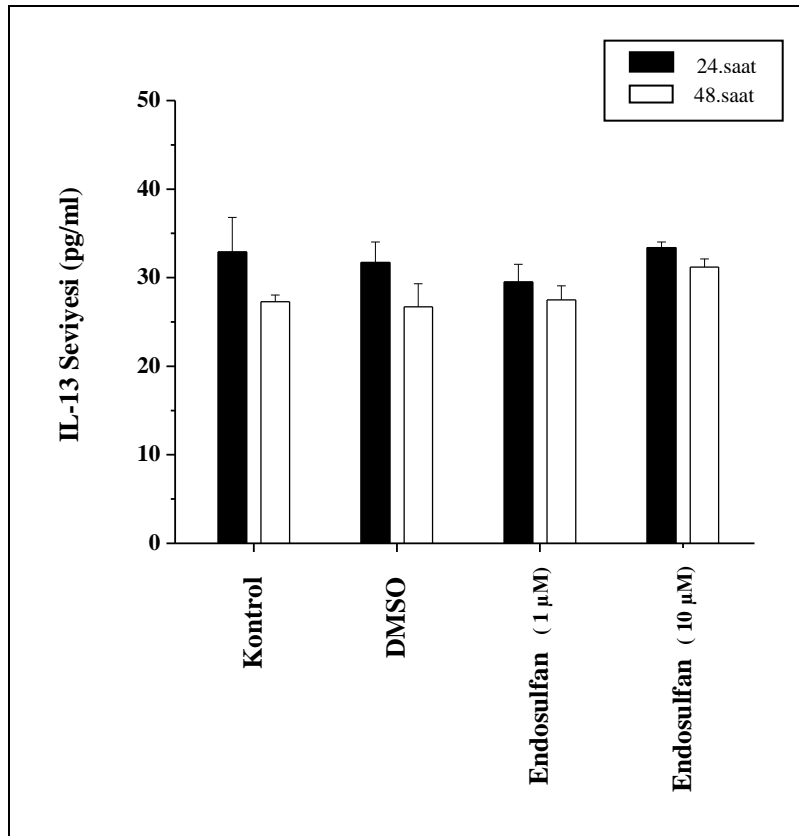


**Şekil 5.4:** 10 µg/mL KonA varlığında PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).



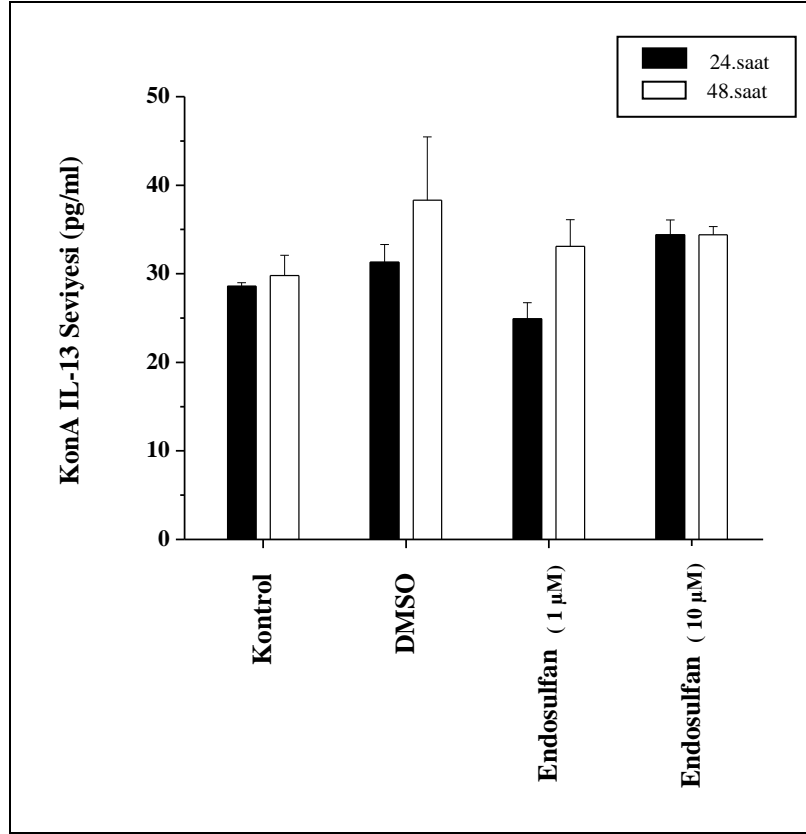
### 5.1.3. Endosulfanın IL-13 seviyeleri üzerine etkisi

Lenfosit hücreleri 1 ve 10  $\mu\text{M}$  endosulfan ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IL-13 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.5' de gösterildi. Endosulfanın 1 ve 10  $\mu\text{M}$ ' lık konsantrasyonu, IL-13 seviyesinde hem 24 hem de 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.



**Şekil 5.5:** Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, 1 ve 10 µM endosulfan ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra yapılan analizlerde, IL-13 seviyelerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.6).

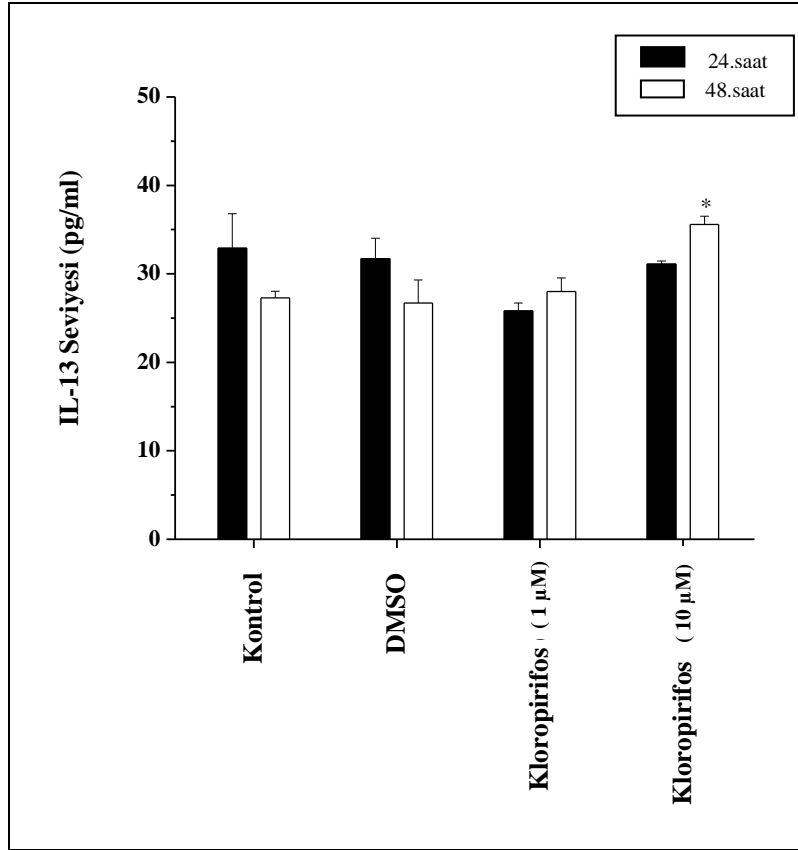


**Şekil 5.6:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum ile yapılan analizlerde endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Varyans analiz Tukey).

#### 5.1.4. Kloropirifosun IL-13 seviyeleri üzerine etkisi

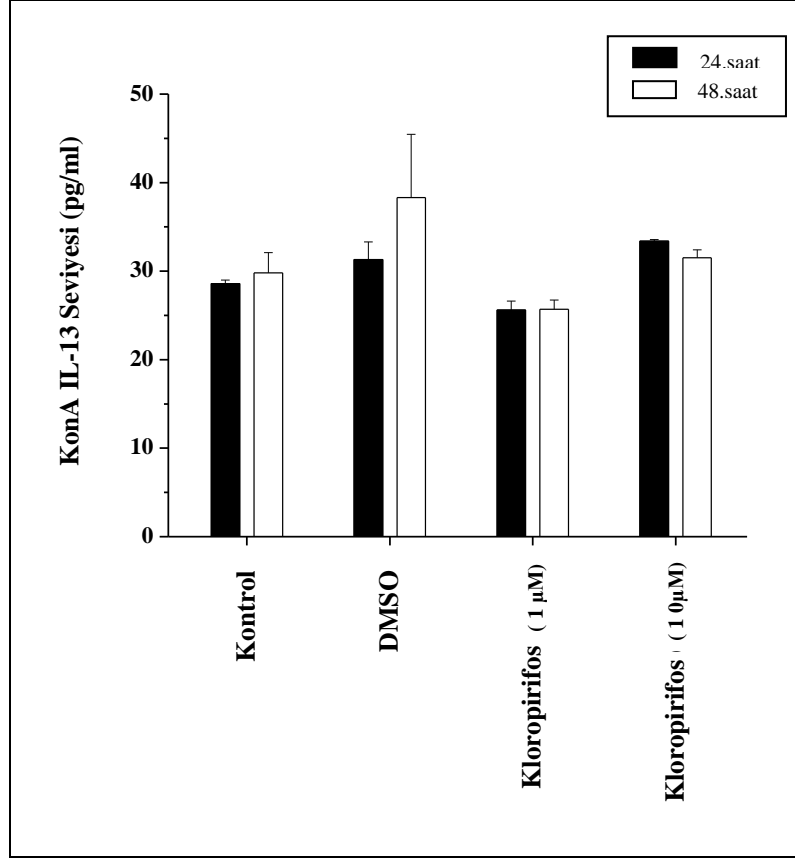
Kloropirifosun lenfosit hücrelerine 1 ve 10 µM uygulanması sonucunda zamana bağımlı olarak 48. saat sonunda 10 µM'lık uygulamasında IL-13

seviyesinde anlamlı bir artışa neden olurken ( $p<0.05$ ), 1  $\mu\text{M}$ 'lık uygulamasın da anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 5.7).



**Şekil 5.7:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\* $p<0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu\text{g/mL}$  KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, 1 ve 10  $\mu\text{M}$  kloropirifos ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra IL-13 seviyelerinde bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.8).

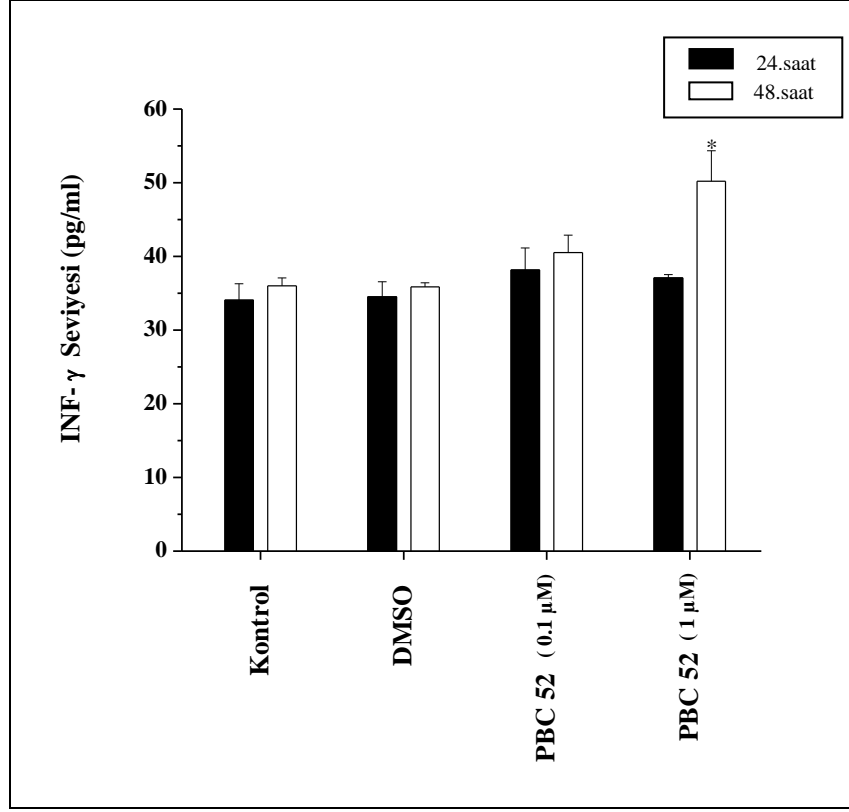


**Şekil 5.8:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IL-13 seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

## 5.2. IFN- $\gamma$ sonuçları

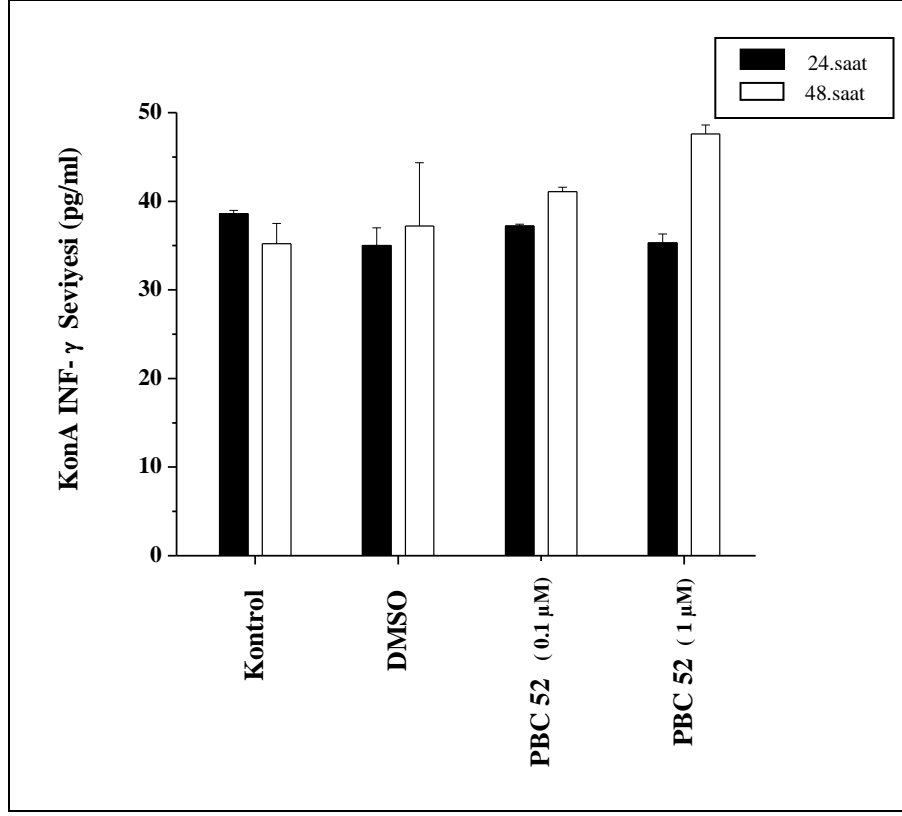
### 5.2.1. PCB 52' nin IFN- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi

Lenfosit hücreleri 0.1 ve 1  $\mu$ M PCB 52 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.9' de gösterildi. PCB 52' nin 0.1 ve 1  $\mu$ M' lık konsantrasyonu, IFN- $\gamma$  seviyesinde 24 saat sonunda bir değişikliğe neden olmamıştır; buna rağmen 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir artışa neden olmuştur ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 5.9:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\* $p$ <0.05, Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu$ g/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri 0.1 ve 1  $\mu$ M PCB 52 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra IFN- $\gamma$  seviyelerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.10).

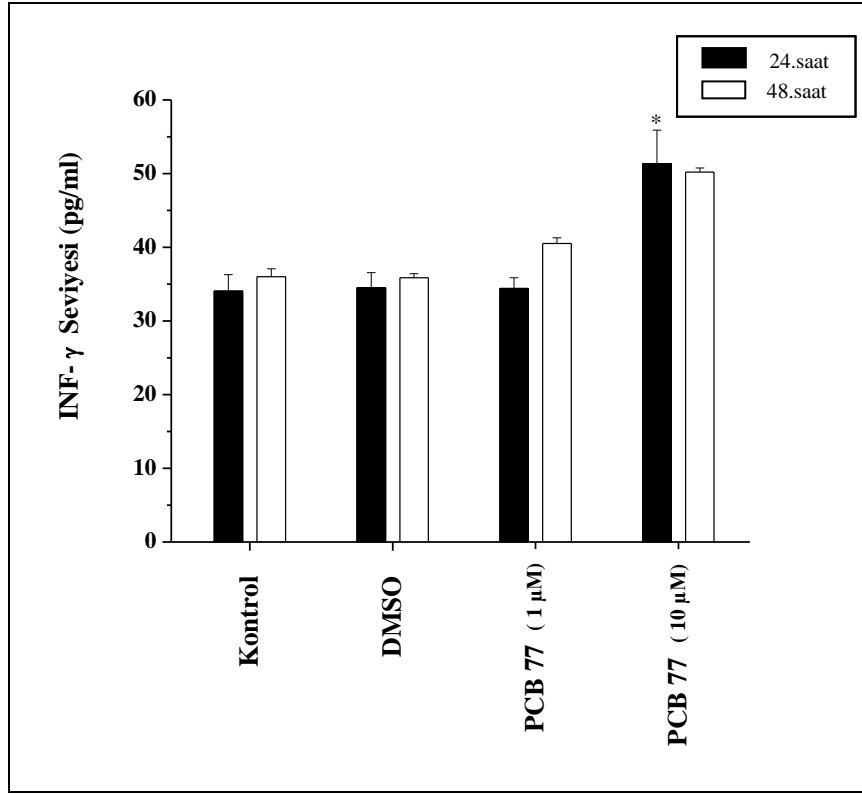


**Şekil 5.10:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

### 5.2.2. PCB 77' nin IFN- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi

Lenfosit hücreleri PCB 77 ile 1 ve 10  $\mu$ M muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.11' de gösterildi. PCB 77' nin 1  $\mu$ M' lık konsantrasyonu IFN- $\gamma$  seviyesinde 24 ve 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. PCB 77' nin 10  $\mu$ M' lık konsantrasyonu IFN- $\gamma$  seviyesinde 24 saatlik zaman periyodunda

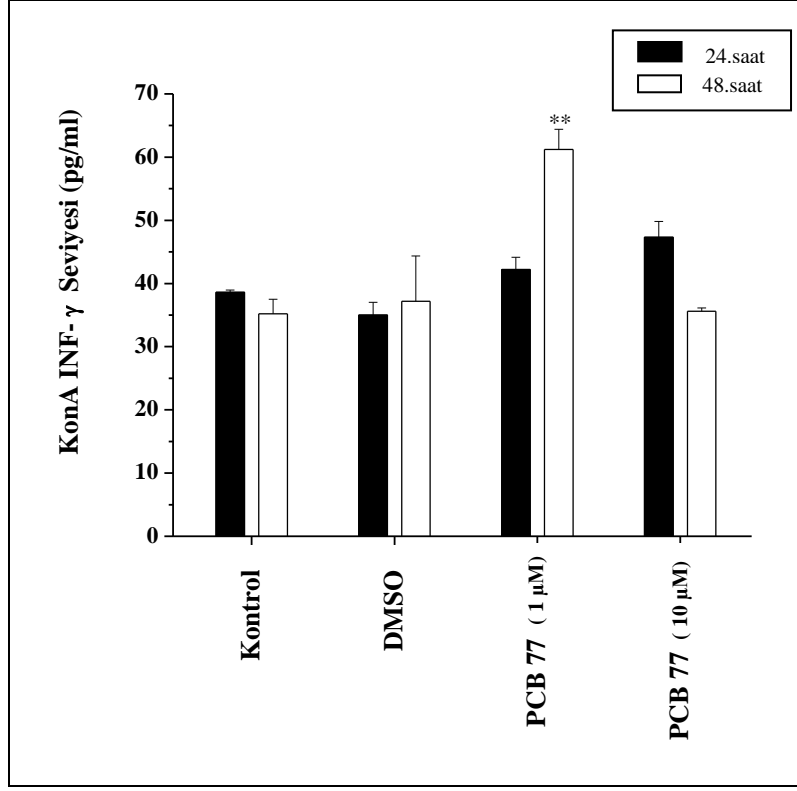
anlamli bir değişikliğe neden olurken 48 saatlik zaman diliminde anlamli bir değişikliğe neden olmamıştır.



**Şekil 5.11:** PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\*p<0.05, Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu$ g/mL KonA varlığında IFN- $\gamma$  seviyesinde PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinde 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonunda her iki zaman periyodunda da anlamli bir değişiklik meydana

gelmemiştir. Ancak 1  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonunda 48. saat sonunda anlamlı bir artış meydana gelmiştir ve bu değişiklikler Şekil.5.12' de gösterilmiştir ( $p<0.01$ ).



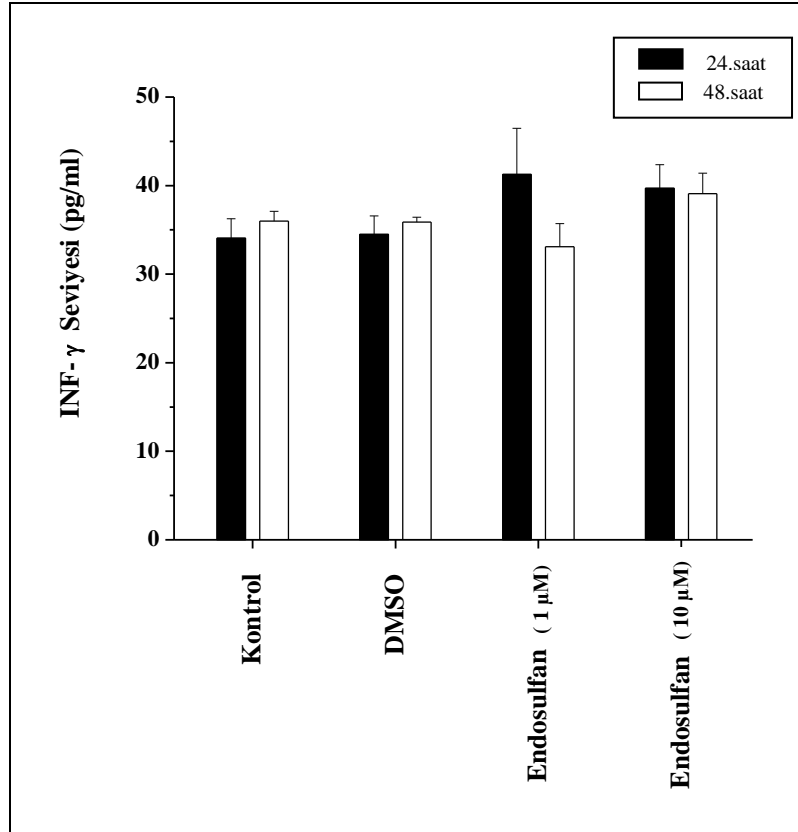
**Şekil 5.12:** 10  $\mu\text{g/mL}$  KonA ihtiva eden medyum ile yapılan analizlerde PCB 77' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerindeki IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\*\* $p<0.01$ , Varyans analiz Tukey).

### 5.2.3. Endosulfanın IFN- $\gamma$ seviyeleri üzerine etkisi

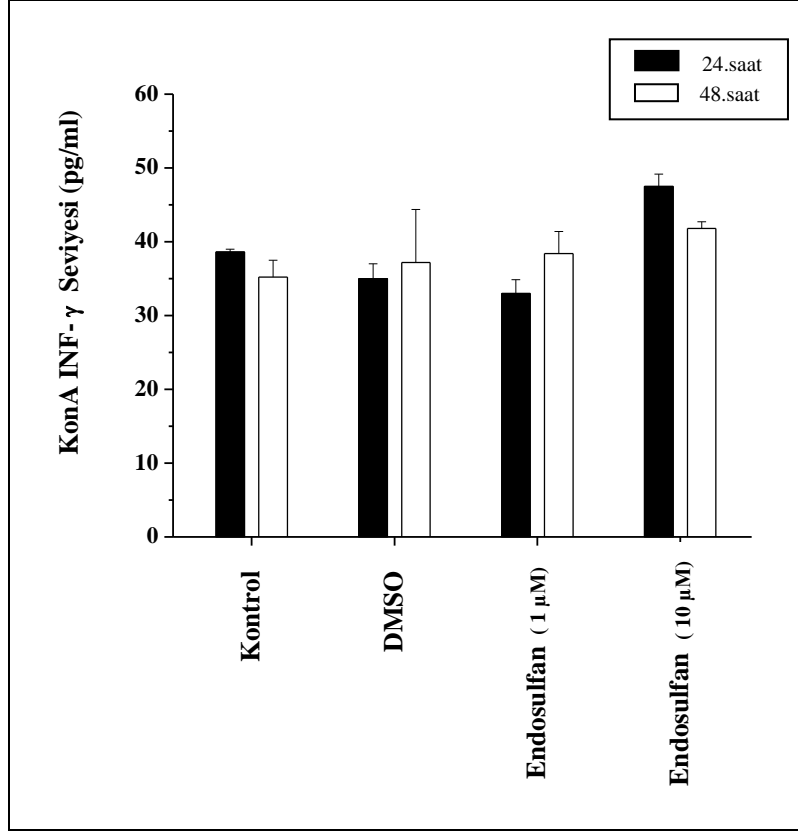
Lenfosit hücre kültürlerine 1 ve 10  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlarda endosulfan uygulamasının, IFN- $\gamma$  seviyeleri üzerinde 24 ve 48 saat sonra anlamlı bir



değişiklik meydana gelememiştir ve değişiklikler Şekil 5.13' de, 10 µg/mL KonA varlığında meydana gelen farklılıklar da Şekil 5.14' de gösterilmiştir ( $p<0.05$ ).



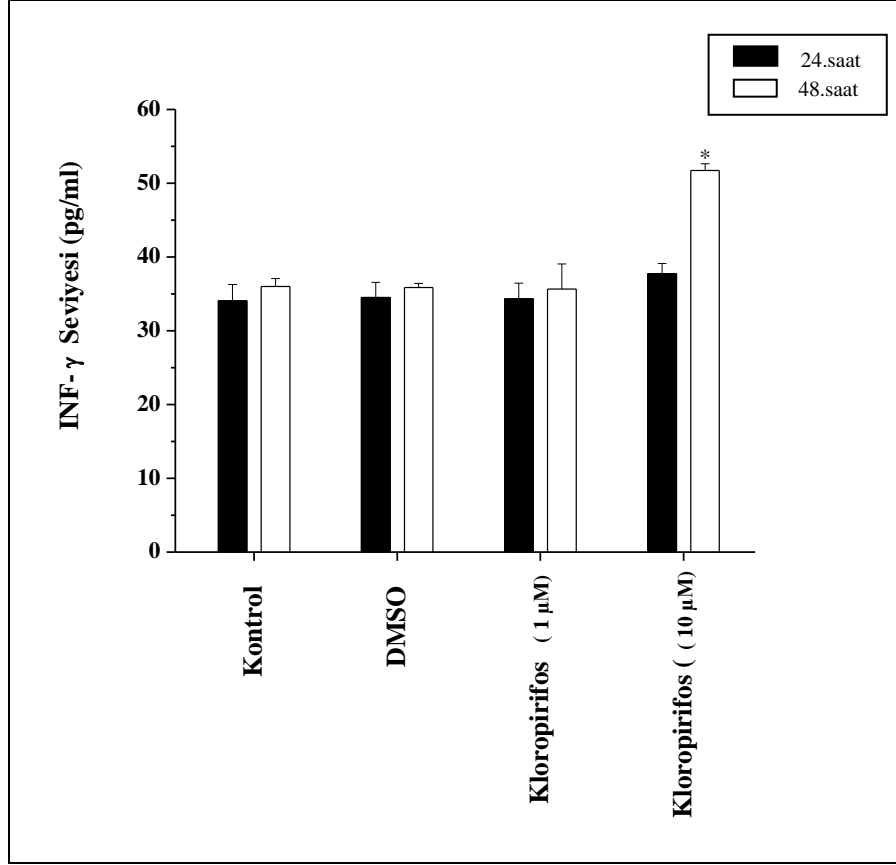
**Şekil 5.13:** Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p<0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).



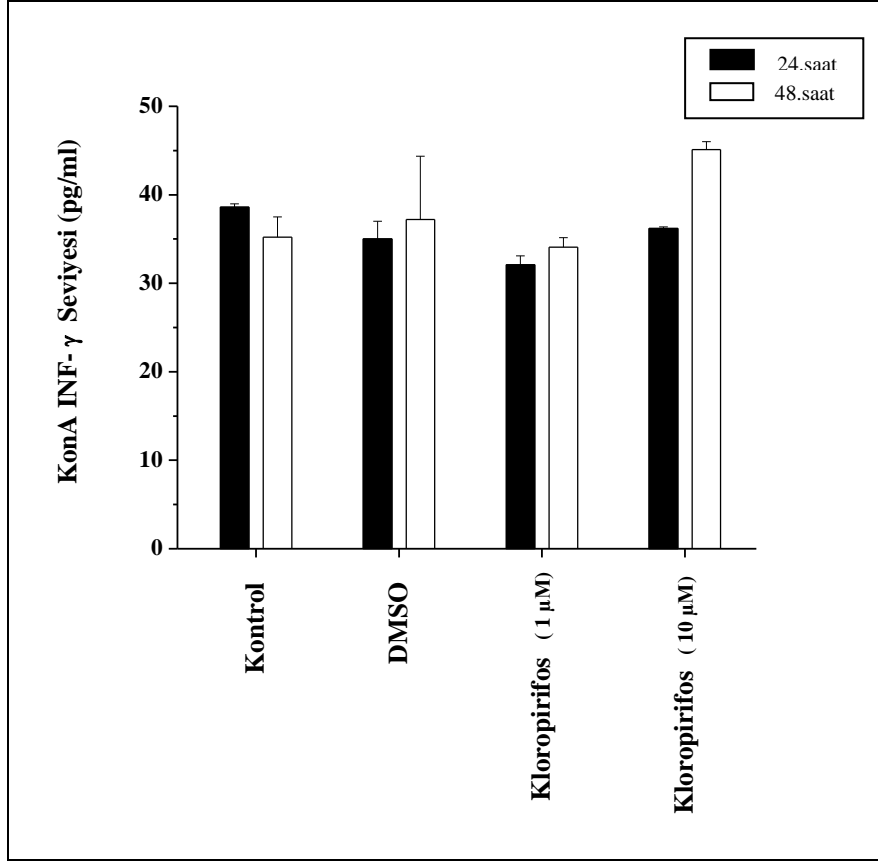
**Şekil 5.14:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN-γ seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (p<0.05, Varyans analiz Tukey).

#### 5.2.4. Kloropirifosun IFN-γ seviyeleri üzerine etkisi

Kloropirifosun lenfosit hücrelerine 1 ve 10 µM ile muamelesi sonucunda zamana bağımlı olarak 48. saat sonunda 10 µM'lık uygulamasında IFN-γ seviyesinde anlamlı bir artışa neden oldu (p<0.05) (Şekil 5.15). 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücrelerinin analizlerde ise 24 ve 48 sonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 5.16).



**Şekil 5.15:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$  SH) değişiklikler (\* $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).



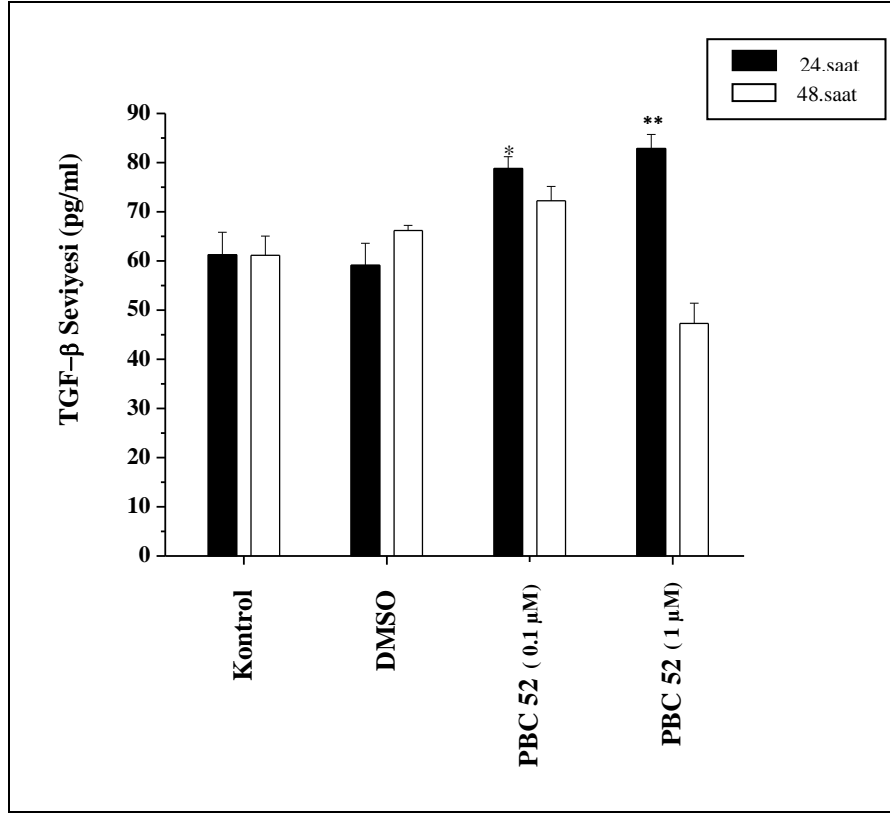
**Şekil 5.16:** 10 µg/mL KonA varlığında kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin IFN- $\gamma$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

### 5.3. TGF- $\beta$ sonuçları

#### 5.3.1. PCB 52' nin TGF- $\beta$ seviyeleri üzerine etkisi

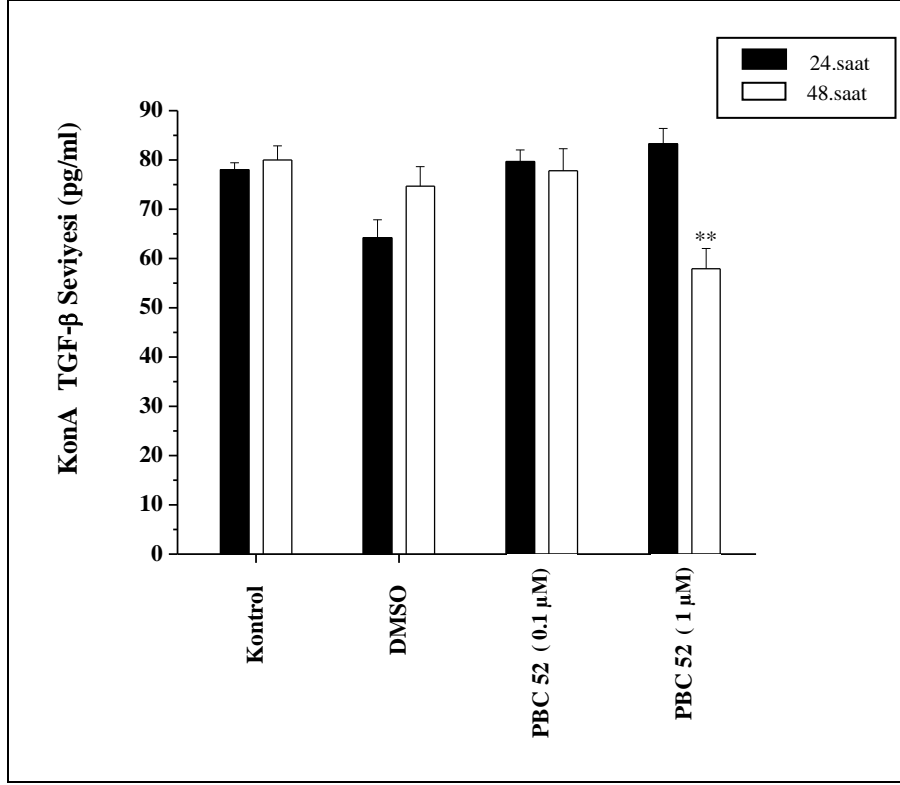
Lenfosit hücre kültürüne 0.1 ve 1 µM PCB 52 ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, TGF- $\beta$  seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.17' de gösterildi. PCB 52' nin 0.1 ve 1 µM' lık konsantrasyonunda 24 saat sonunda TGF-

$\beta$  seviyesinde doza bağımlı olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) ancak; 48 saat sonunda anlamlı bir değişim gözlenmedi.



**Şekil 5.17:** PCB 52 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu$ g/mL KonA varlığında PCB 52' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$  seviyesinde, 48. saatin sonunda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ( $p<0.01$ ) ve meydana gelen değişiklikler Şekil 5.18' de gösterilmiştir.

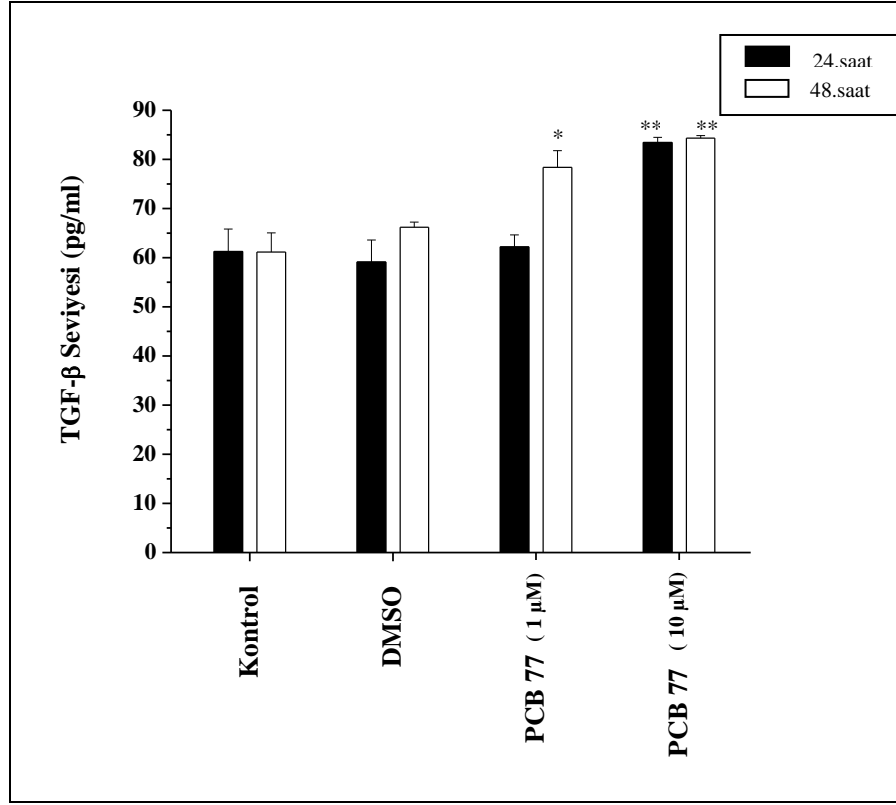


**Şekil 5.18:** 10 µg/mL KonA varlığında PCB 52' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (\*\*p<0.01, Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

### 5.3.2. PCB 77' nin TGF-β seviyeleri üzerine etkisi

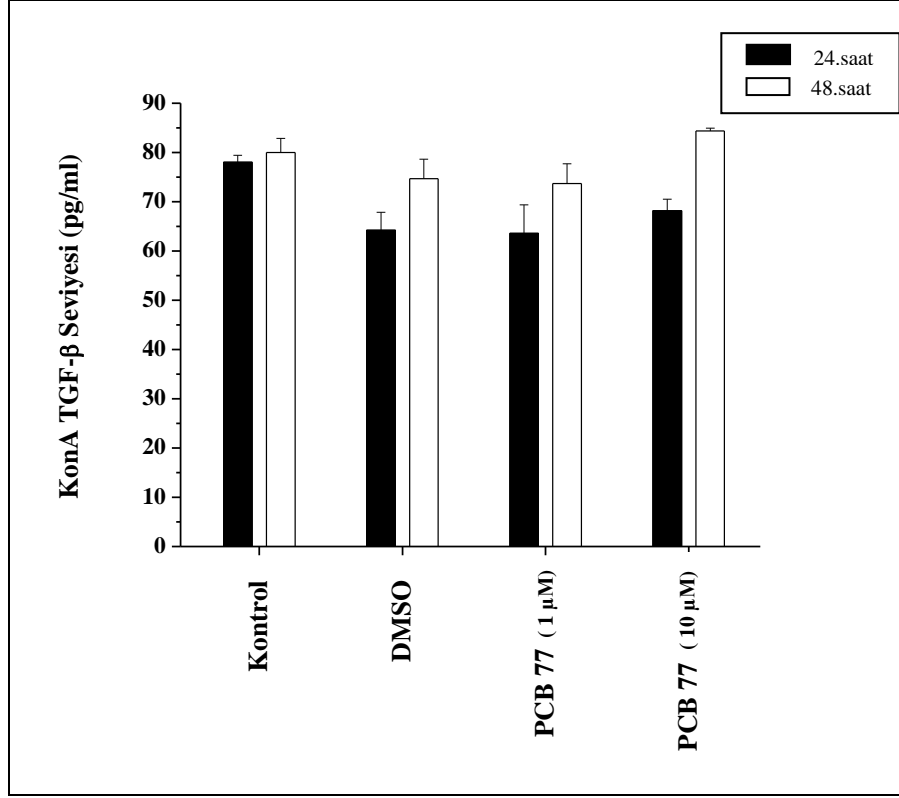
Lenfosit hücreleri PCB 77 ile 1 ve 10 µM ile muamele edildikten 24 ve 48 saat sonra, TGF-β seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 5.19' da gösterildi. PCB 77' nin 1 µM' lık konsantrasyonu TGF-β seviyesinde 48 saatlik zaman periyodunda anlamlı bir artışa neden olmuştur (p<0.05). PCB 77' nin 10 µM' lık konsantrasyonu TGF-β seviyesinde 24 ve 48 saatlik zaman

periyodunda hem zamana hem de doza bağımlı olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmuştur ( $p<0.01$ ).



**Şekil 5.19:** PCB 77 uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu$ g/mL KonA varlığında lenfosit hücrelerinde TGF- $\beta$  seviyesinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil.5.20).

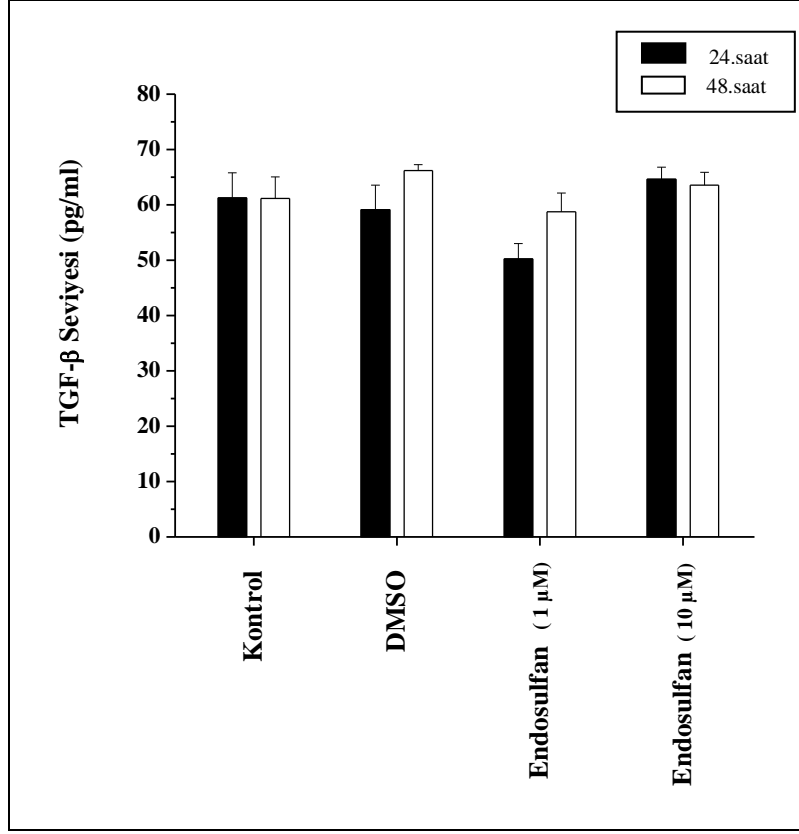


**Şekil 5.20:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, PCB 77' nin uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerindeki TGF-β seviyelerinde meydana gelen (Ort± SH) değişiklikler (p<0.05, Varyans analiz Tukey).

### 5.3.3. Endosulfanın TGF-β seviyeleri üzerine etkisi

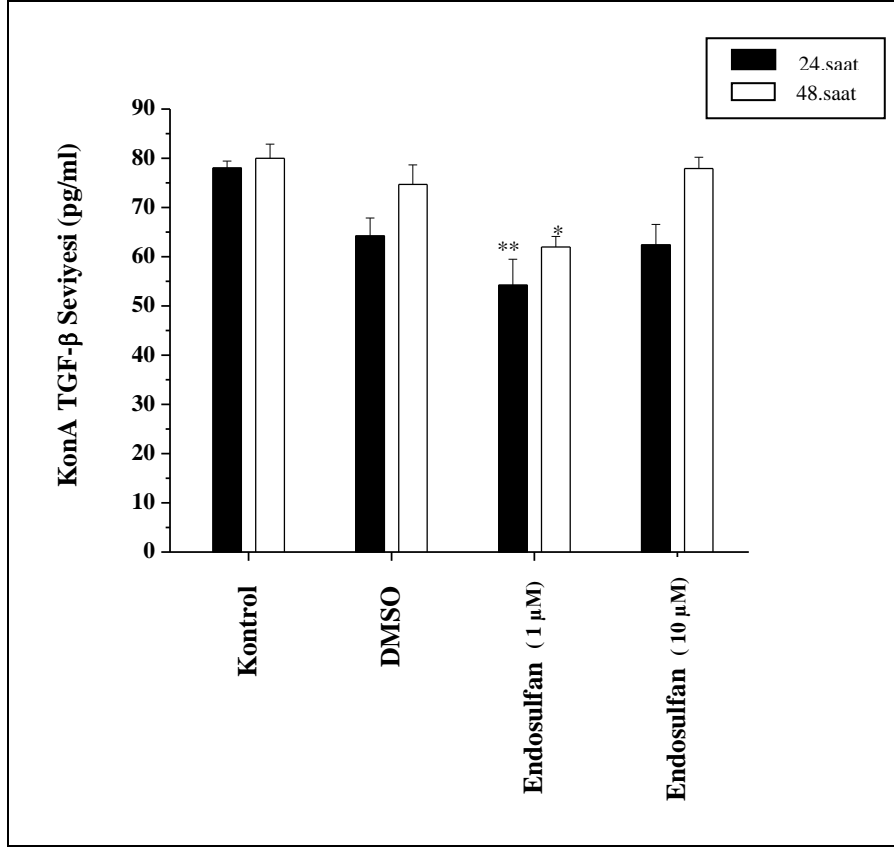
Lenfosit hücre kültürlerine 1 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarda Endosulfan uygulamasında, TGF-β seviyelerinde 24 ve 48 saat sonunda anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 5.21).





**Şekil 5.21:** Endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

10  $\mu\text{g/mL}$  KonA varlığında endosulfanın 1 ve 10  $\mu\text{M}$ ' lık konsantrasyonlarda uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinde, 1  $\mu\text{M}$ ' lık konsantrasyonlarda TGF- $\beta$  seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlenirken; 10  $\mu\text{M}$ ' lık konsantrasyonlarda anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 5.22) ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

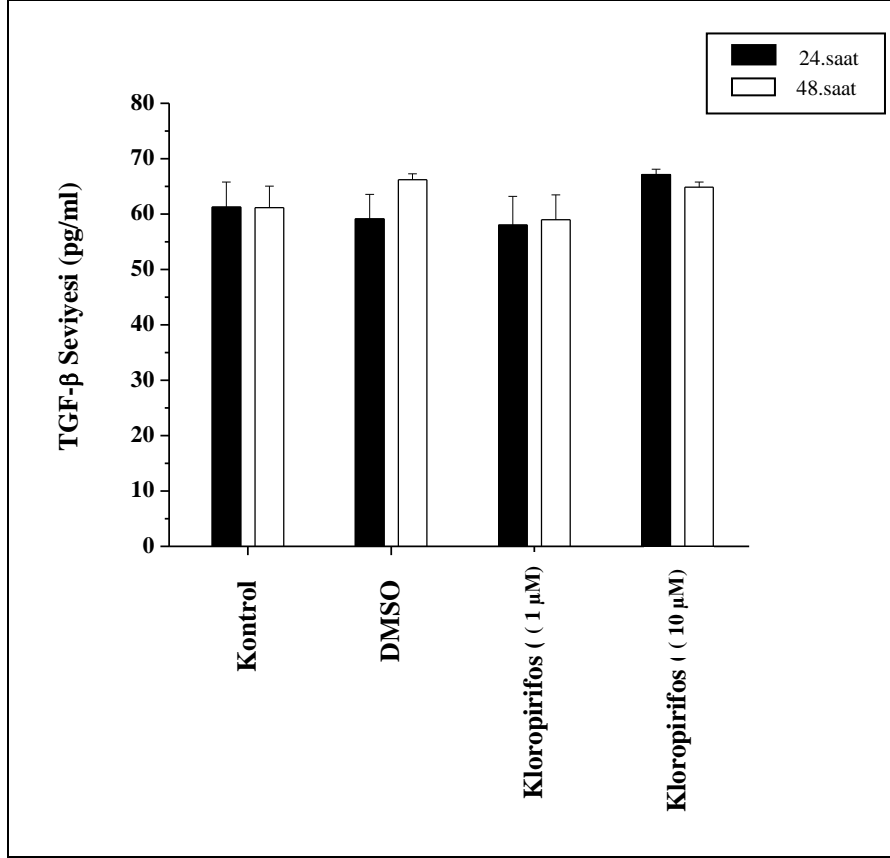


**Şekil 5.22:** 10 µg/mL KonA ihtiva eden medyum içerisindeki lenfosit hücreleri, endosulfan uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (\*p<0.05, \*\*p<0.01 Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

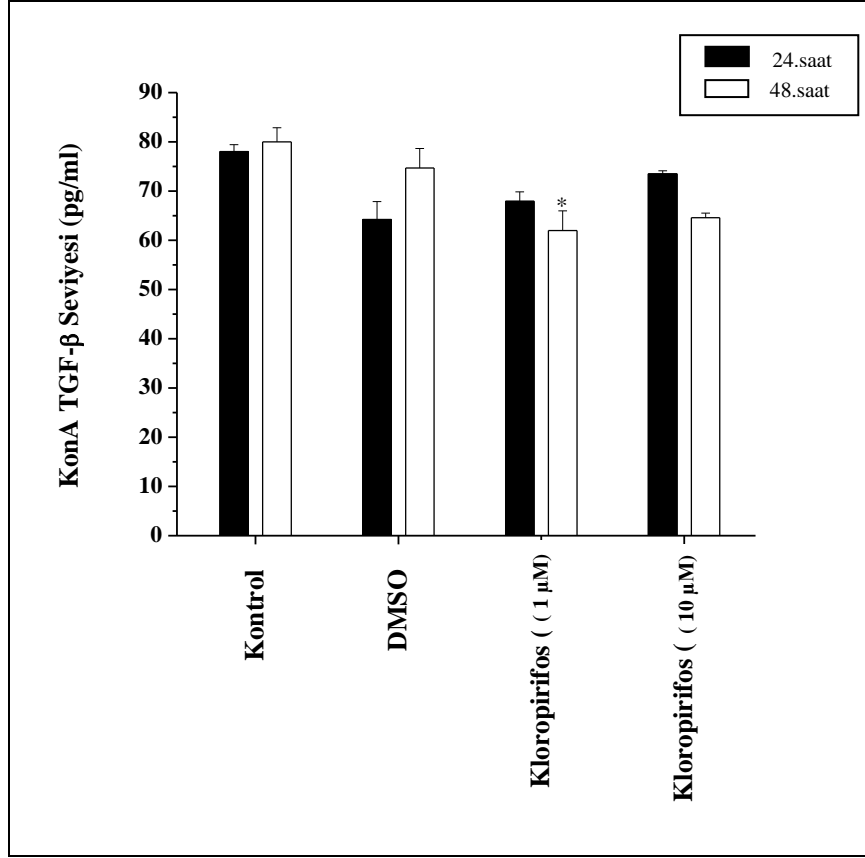
#### 5.3.4. Kloropirifosun TGF-β seviyeleri üzerine etkisi

Kloropirifosun lenfosit hücrelerine 1 ve 10 µM ile muamelesi sonucunda TGF-β seviyeleri üzerinde 24 ve 48 saat sonunda anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 5.23); 10 µg/mL KonA varlığında kloropirifosun lenfosit hücrelerine 1 ve 10 µM ile muamelesi sonucunda TGF-β seviyeleri üzerinde

1  $\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda 24 saatte anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ancak 48 saatte anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5.24).



**Şekil 5.23:** Kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF- $\beta$  seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$  SH) değişiklikler ( $p < 0.05$ , Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).



**Şekil 5.24:** 10 µg/mL KonA varlığında kloropirifosun uygulamasını takiben 24 ve 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin TGF-β seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (\*p<0.05, Tek Yönlü Varyans Analizi Post Hoc. Tukey).

#### 5.4. CD değerleri

##### 5.4.1. Poliklorlu bifenillerin CD değerleri üzerine etkileri

Lenfosit hücreleri PCB 52 ve PCB 77 ile muamele edildikten 48 saat sonra kontrollere göre immünofenotipler (CD yüzey belirteçleri) üzerine etkileri Tablo 5.1' de gösterildi. Gruplar arası anlamlı farklılıkların "p" değerleri tablo üzerinde gösterilmiştir.

	KONTROLLER	PCB 52 (0.1 µM) 48 h	PCB 52 (1 µM) 48 h	PCB 77 (1 µM) 48 h	PCB 77 (10 µM) 48 h
CD 45	% 98.44	% 67.59 <b>p&lt; 0.001</b>	% 78.15 <b>p&lt; 0.0001</b>	% 85.75	% 75.42 <b>p&lt; 0.0001</b>
CD 3	% 68.04	% 72.86	% 76.70	% 69.26	% 74.30
CD 4	% 38.00	% 48.83	% 40.80	% 34.70	% 38.16
CD 8	% 31.91	% 23.05	% 30.48	% 22.05	% 34.12
CD 19	% 7.81	% 17.78	% 17.87	% 25.54 <b>p&lt; 0.01</b>	% 15.63
CD 16+56	% 20.99	% 23.58	% 28.18	% 37.68 <b>p&lt; 0.05</b>	% 34.26
CD 4+25	% 5.27	% 15.67 <b>p&lt; 0.05</b>	% 17.16 <b>p&lt; 0.05</b>	% 22.68	% 17.54
CD 4+26	% 22.15	% 23.25	% 28.97	% 22.46	% 23.64
CD 4+30	% 2.66	% 11.25	% 20.83 <b>p&lt; 0.001</b>	% 18.24 <b>p&lt; 0.01</b>	% 14.67
CD 23	% 10.30	% 22.22 <b>p&lt; 0.05</b>	% 27.89 <b>p&lt; 0.01</b>	% 14.13	% 16.13

**Tablo 5.1 :** PCB 52 ve PCB 77' nin uygulamasını takiben 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin CD seviyelerinde meydana gelen (Ort± SH) değişiklikler (Ki-Kare Test).

#### 5.4.2. Pestisitlerin CD değerleri üzerine etkileri

Lenfosit hücreleri kloropirifos ve endosulfan ile muamele edildikten 48 saat sonra kontrollere göre immünofenotip (CD yüzey belirteçleri) üzerine etkileri Tablo 5.2' de gösterildi. Gruplar arası anlamlı farklılıkların "p" değerleri tablo üzerinde gösterilmiştir.

	KONTROLLER	Kloropirifos (1 µM) 48 h	Kloropirifos (10 µM) 48 h	Endosulfan (1 µM) 48 h	Endosulfan (10 µM) 48 h
<b>CD 45</b>	% 98.44	% 86.50	% 71.50 <b>p&lt;0.0001</b>	% 31.40 <b>p&lt;0.0001</b>	% 81.91 <b>p&lt;0.001</b>
<b>CD 3</b>	% 68.04	% 45.40 <b>p&lt;0.01</b>	% 76.85	% 55.80	% 66.91
<b>CD 4</b>	% 38.00	% 21.82 <b>p&lt;0.05</b>	% 41.40	% 24.70	% 32.60
<b>CD 8</b>	% 31.91	% 11.90 <b>p&lt;0.01</b>	% 33.30	% 21.14	% 30.00
<b>CD 19</b>	% 7.81	% 8.57	% 15.12	% 9.35	% 9.55
<b>CD 16+56</b>	% 20.99	% 18.75	% 13.02	% 12.39	% 13.27
<b>CD 4+25</b>	% 5.27	% 21.05 <b>p&lt;0.01</b>	% 15.79 <b>p&lt;0.05</b>	% 11.20	% 7.02
<b>CD 4+26</b>	% 22.15	% 13.51	% 32.50	% 18.26	% 19.62
<b>CD 4+30</b>	% 2.66	% 14.62	% 12.31 <b>p&lt;0.05</b>	% 10.66	% 2.96
<b>CD 23</b>	% 10.30	% 29.41 <b>p&lt;0.01</b>	% 15.70	% 11.11	% 36.16 <b>p&lt;0.0001</b>

**Tablo 5.2 :** Kloropirifos ve endosulfanın uygulamasını takiben 48 saat sonra kontrole göre lenfosit hücrelerinin CD seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (Ki-Kare Test).

#### 5.4.3. Poliklorlu bifenillerin doz bağımlı CD değerleri üzerine etkileri

Lenfosit hücrelerine PCB 52' nin 0.1 ve 1 µM, PCB 77' nin 1 ve 10 µM dozlarında uygulanmasından 48 saat sonra doza bağımlı olarak immünofenotip (CD yüzey belirteçleri) seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmedi ve meydana gelen etkiler Tablo 6.3' de gösterildi.

	PCB 52 (0.1 µM) 48 h	PCB 52 (1 µM) 48 h	PCB 77 (1 µM) 48 h	PCB 77 (10 µM) 48 h
CD 45	% 67.59	% 78.15	% 85.75	% 75.42
CD 3	% 72.86	% 76.70	% 69.26	% 74.30
CD 4	% 48.83	% 40.80	% 34.70	% 38.16
CD 8	% 23.05	% 30.48	% 22.05	% 34.12
CD 19	% 17.78	% 17.87	% 25.54	% 15.63
CD 16+56	% 23.58	% 28.18	% 37.68	% 34.26
CD 4+25	% 15.67	% 17.16	% 22.68	% 17.54
CD 4+26	% 23.25	% 28.97	% 22.46	% 23.64
CD 4+30	% 11.25	% 20.83	% 18.24	% 14.67
CD 23	% 22.22	% 27.89	% 14.13	% 16.13

**Tablo 5.3 :** PCB 52 ve PCB 77 'nin lenfosit hücreleri ile muamele edildikten 48 saat sonra doza bağımlı olarak CD seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (Ki-Kare Test).

#### 5.4.4. Pestisitlerin doz bağımlı CD değerleri üzerine etkileri

Lenfosit hücrelerine kloropirifos ve endosulfanın 1 ve 10 µM dozlarda uygulanmasından 48 saat sonra doza bağımlı olarak immünofenotip (CD yüzey belirteçleri) seviyelerinde anlamlı bir fark gözlemlendi ve meydana gelen etkiler Tablo 6.4' de gösterildi. Dozlar arası anlamlı farklılıkların "p" değerleri tablo üzerinde gösterilmiştir.

	<b>Kloropirifos (1 µM) 48 h</b>	<b>Kloropirifos (10 µM) 48 h</b>	<b>Endosulfan (1 µM) 48 h</b>	<b>Endosulfan (10 µM) 48 h</b>
<b>CD 45</b>	% 86.50	% 71.50 <b>p&lt;0.05</b>	% 31.40	% 81.91 <b>p&lt;0.0001</b>
<b>CD 3</b>	% 45.40	% 76.85 <b>p&lt;0.0001</b>	% 55.80	% 66.91
<b>CD 4</b>	% 21.82	% 41.40	% 24.70	% 32.60
<b>CD 8</b>	% 11.90	% 33.30	% 21.14	% 30.00
<b>CD 19</b>	% 8.57	% 15.12	% 9.35	% 9.55
<b>CD 16+56</b>	% 18.75	% 13.02	% 12.39	% 13.27
<b>CD 4+25</b>	% 21.05	% 15.79	% 11.20	% 7.02
<b>CD 4+26</b>	% 13.51	% 32.50 <b>p&lt;0.001</b>	% 18.26	% 19.62
<b>CD 4+30</b>	% 14.62	% 12.31	% 10.66	% 2.96
<b>CD 23</b>	% 29.41	% 15.70 <b>p&lt;0.05</b>	% 11.11	% 36.16

**Tablo 5.4 :** Kloropirifos ve endosulfanın lenfosit hücreleri ile muamele edildikten 48 saat sonra doza bağımlı olarak CD seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (Ki-Kare Test).



## 6. TARTIŞMA

### ***Poliklorlu bifenillerin sitokin üretimi üzerine olan etkileri:***

Sitokinlerin çoğu temel olarak çok küçük miktarları ile etkili olan, kısa yarı ömürlü, parakrin ve otokrin aktivitelere sahip, glikoprotein yapıda moleküllerdir. Bununla birlikte, bir kısım sitokinler endokrin yolla vücudun uzak bölgelerine periferik dolaşım ile ulaşarak, bu bölgelerde de etkili olurlar (70). Farklı hastalık durumlarında ya da yapılan *in vitro* çalışmalarla, Th1 ve Th2 hücrelerinin ürettiği sitokin seviyelerinde farklılıklar olabileceği gösterilmiştir. Otoimmün hastalıkların patogenezinde genellikle Th1 ve Th2 baskınlığının önemli olduğuna inanılmaktadır (71). Sandal ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada poliklorlu bifenillerden PCB 52 ve PCB 77' nin timüs hücre kültüründe, Th1/Th2 polarizasyonuna ve sitokin salınım profiline etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada poliklorlu bifenillerin fare timosit kültüründe sitokin üretim profilini belirgin bir şekilde Th1 yönünde değiştirdiği vurgulanmıştır. Özellikle PCB' ler IFN- $\gamma$  seviyesinde önemli bir artışa neden olurken IL-10 seviyesinde de bir azalmaya yol açmaktadır (72). Çalışmamızda PCB 52 ve PCB 77' nin lenfosit hücre kültürüne uygulanmasında IFN- $\gamma$  seviyesinde anlamlı bir artışa neden olurken, KonA' lı hücre kültüründe ise sadece PCB 77' nin IFN- $\gamma$  seviyesini anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi. Sandal ve arkadaşlarının poliklorlu bifenillerle yapmış oldukları başka bir çalışmada, insan lenfosit hücre kültürüne yüksek dozda PCB 52 ve PCB 77 uygulandığında DNA kırılmaları olduğu ve bunun da DNA hasarlarına neden olduğu gösterilmiştir (73). PCB 77 kullanılan başka bir çalışmada nöral hücre kültürüne de zamana ve

konsantrasyona bağımlı olarak hücrede apoptozu hızlandırdığı gözlenmiştir (74). Planar PCB'lerin etki mekanizmaları, toksik etkisi yüksek TCDD ile aynıdır (75). Planar PCB bileşenlerinin toksik etkilerini TCDD'nin etki mekanizmasında olduğu gibi Ah reseptörü üzerinden gösterdiği rapor edilmiştir (76). TCDD ile yapılan bir çalışmada dalak hücre kültürlerinde Th2 hücre sitokinlerinden IL-4 ve IL-5 salınımını belirgin bir şekilde baskıladığı, IFN- $\gamma$  seviyelerini de yükselttiği bildirilmiştir (77). Bu sonuçlar, poliklorlu bifenillerin Th2 hücre sitokinlerinin üretimini baskılayarak humoral immüneyi zayıflattığını ve Th1/Th2 dengesini Th1 yönünde arttırdığını göstermektedir. Çalışmamızda ise KonA içermeyen medyumda PCB uygulamalarını takiben temel Th1 sitokini olan IFN- $\gamma$  seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. KonA ile uyarılmamış hücrelerde PCB uygulaması TGF- $\beta$  düzeylerini doza ve zamana bağımlı artırırken, KonA uygulanan ortamda TGF- $\beta$  seviyelerinde zamana bağımlı bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma hücre kültürünün temel Th2 sitokinlerinden olan IL-13 te ise gerek KonA ile uyarılmış gerekse KonA ile uyarılmamış grup da anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Çalışmamızda IFN- $\gamma$  seviyelerinde ki anlamlı artışın Th2 humoral immüneyi baskıladığını göstermektedir.

#### ***Pestisitlerin sitokin üretimi üzerine olan etkileri:***

Sitokinler, doğal ve spesifik immün yanıt oluşumunda, immün sistem hücrelerinin karşılıklı ilişkilerini düzenleyen glikoprotein yapısında maddelerdir. Hücreler arası sinyal proteinleri olan sitokinler, immün ve inflamatuvar yanıt oluşumu, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi farklı birçok olayın düzenlenmesinde rol alır (70). Th1 hücreleri IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$  ve IL-2

sitokinlerini sekrete ederken, Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-6, IL-6 ve IL-13 sitokinlerini sekrete ederler (70). Th1 grup sitokinlerin temel görevi hücrel immün yanıtı uyarmak, Th2 grup sitokinlerin ise humoral yanıtını uyarmaktır. Pestisitlerin yüksek konsantrasyonlarının insan NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir ve vücuda girdiğinde NK hücrelerinin 24 saatten kısa bir sürede işlevlerini yerine getirdiği gözlenmiştir (53). Organoklorlu bir pestisit olan endosulfan ile yapılan bir çalışmada immünotoksik etkileri incelenmiştir ve erkek sıçanlara farklı dozlarda 5, 10 ve 20 ppm ve 8-22 hafta süresince yapılan uygulamanın lökosit göçünü ve özellikle monosit göçünü baskıladığı ayrıca hücrel ve humoral immüneyi baskıladığından IgM ve IgG düzeylerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (32). Endosulfan da içeren Hekzaklorobenzen, DDT, PCB, mireks, heptaklor, aldrin ve dieldrinden oluşan bir karışımın immün fonksiyonlar üzerine etkileri erkek ratlarda incelenmiş ve NK hücre aktivitesi ile lenfosit proliferasyonunun önemli şekilde baskılandığı belirlenmiştir (34). TGF- $\beta$  temelde inhibitör bir sitokin olarak görev yapar ve diğer bir etkisi ise B lenfosit hücrelerinde IgA yapımını arttırmaktır (78). Çalışmamızda da endosulfanın TGF- $\beta$ ' da hem doza hem de zamana bağımlı olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu saptadık. Bu etkide B hücrelerinde ki mukoza koruyucu özelliği bilinen IgA düzeylerinde dolaylı bir azalma yapıyor, bu da ilave çalışmalarla gösterilebilir.

Organofosfat yapısında geniş spektrumlu bir pestisit olan kloropirifosun, canlı dokularında birikme özelliği gösterdiği bilinmektedir (41). Organofosfatlı pestisitler primer olarak asetilkolin esteraz enzimini inhibe ederek nörotoksik etki gösterirler (43). Asetilkolin esteraz inhibisyonunun yanı sıra, serin hidrolaz içeren

enzimler bu pestisitlerin hedefi olabilir. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu asetilkolin birikir. Asetilkolin reseptörlerinin sürekli uyarımı sonucu muskarinik ve nikotinik bulgular ortaya çıkabilir. Sinir-düz kas ve sinir-salgı bezi kavşaklarında asetilkolinin artması salgılarda ve kas kontraksiyonlarında artışın görülmesine neden olabilir. Santral sinir sisteminde davranışsal ve duygusal bozukluklara, iskelet kaslarında seyirmelere, koordinasyon bozukluğuna ve solunum baskılanmasına neden olabilirler (79-81). Organofosfatlı pestisitlerin immünotoksik etkileri Galloway ve Handy tarafından değerlendirilmiştir (42). Başka bir çalışmada bir ay süreyle haftada iki kez oral gavajla 5 mg/kg kloropirifos uygulanan sıçanlarda, KonA ile indüklenmiş T-lenfosit blastojenezinin bozulduğu bildirilmiştir (43). Kronik olarak kloropirifosa maruz kalan ve sağlık sorunları yaşayan 29 kişilik bir kohort çalışmada bireyler periferik lenfosit fenotipleri, otoantikör üretimi ve mitojenezis yönünden araştırılmıştır. Bu olgularda yaş ve cinsiyet farkı olmaksızın, KonA ile indüklenmiş mitojeneziste azalma ve otoantikör üretiminde artış belirlenmiştir (44). Çalışmamızda KonA ile uyarılmayan lenfosit hücre kültüründe zamana bağımlı olarak IFN- $\gamma$  seviyesinde anlamlı bir artma gözlenirken, KonA ile indüklenen lenfosit hücre kültüründe TGF- $\beta$ ' da zamana bağımlı anlamlı bir azalma göstermiştir. Bu kloropirifosun Th1 proliferasyonunu artırıcı etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Sonuçta makrofajların fagositik gücünde artışa sebep olabileceği düşünülebilir. Bu konuda Blakley ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada makrofaj fagositik aktivitesinde bir değişiklik saptamışlardı (43).

***Poliklorlu bifenillerin immünofenotip belirteçleri üzerine etkileri:***

Vücuttaki lenfosit hücrelerinin % 70-80 kadarını T lenfositler oluştururlar ve periferik kandaki T lenfositlerinin 3/2' sini CD4+, 3/1' ni CD8+ yüzey reseptörleri taşırlar (82). Efektör T hücreleri sitotoksik fonksiyon gösterirler ve CD8+ yüzey reseptörünü taşıyan subpopülasyonu oluştururlar (83). Th hücreleri olarak da adlandırılan CD4+ T lenfositleri; Th1 ve Th2 olmak üzere iki önemli alt gruba ayrılır. CD4+/CD8+ oranı immün balans için önemlidir. Çünkü immün cevabın optimal düzeyde sürdürülmesi bu hücrelerin birbirlerinin fonksiyonlarını kontrol ederek sağlanır (83). PCB bileşenleri doğada uzun yıllar boyunca kalıcı olan bileşenlerdir (10). İnsan sağlığı üzerine toksik etkileri olduğu bilinmekte ancak bu etkilerin hangi dokularda var olduğunun tespit edilmesi daha önemlidir. Bu bileşenlerin insan yağ dokusu, idrar, serum ve süt numunelerinde mevcut olduğunu rapor eden farklı çalışmalar bulunmaktadır (11-13). Bununla ilgili bir çalışma Japonya' nın batı kesiminde ticari bir merkezde ve çevresinde yaşayan, 108 sağlıklı gönüllü annelerin bebeklerinden 3 yıl üst üste Haziran ve Ağustos aylarında numuneler toplanmış ve bebeklerin lenfosit alt gruplarını ölçmek için yapılmıştır (84). Bu çalışmada total T hücreler artarken içerisinde CD8 sitotoksik hücre yüzeylerinin arttığı ve CD4' lerin CD8' lere göre yüzde oranlarının yükseldiği görülmüştür. Yüksek doza maruz kalan bebeklerde aktif T lenfositlerin azaldığı izlenmiştir (84). Çalışmamızda ise lenfosit kültüründe PCB 52 ve PCB 77' nin T hücre ve B hücre fenotipleri üzerine etkilerini araştırdık. Söz konusu PCB' ler total CD45 oranının da anlamlı bir azalmaya neden olurken, total T lenfosit (CD3) ve sitotoksik T hücre ve yardımcı T hücre oranlarında bir farklılık yaratmadığı gözlemlendi. CD4+CD26+ Th1' leri, CD4+CD30+ ise Th2' leri işaret

edebileceği bildirilmiştir (85). Çalışmamızda Th hücrelerinde CD26 ve CD30 ekspresyonlarını araştırdık. CD4+CD26+ yüzdelerinin değişmediği ancak CD4+CD30+ anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. PCB52 ise B hücrelerde artışa yine B hücrelerde IgE reseptörü olan CD23 düzeylerinde artışa, CD4+CD25+ Treg ve NK hücrelerde artışa neden olduğu gözlemlendi. Bunların sonucunda Th2 uyarımı alerji yatkınlığı ve baskılayıcı T hücrelerde artışla hücrel yanıtın tersi yönde etki edebileceği izlenmektedir.

***Pestisitlerin immünofenotip belirteçleri üzerine etkileri:***

Organofosfatlı pestisitlerin immünotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bir ay süreyle kloropirifos uygulanan sıçanlarda KonA ile indüklenmiş T-lenfosit blastojenezisi bozulmuş, CD5+ ve CD8+ taşıyan lenfositlerin oranı artmış, ancak makrofajların fagositik aktivitesinde değişiklik meydana gelmemiştir (43). Çalışmamızda ise kloropirifosun etkisindeki T lenfositlerine bakıldığında total T hücrelerde CD4 (yardımcı) ve CD8 (sitotoksik) azalma gözlenirken, Treg hücrelerde (CD4+25) belirgin artma ve yine B lenfositlerde yüzey ekspresyonu IgE reseptör düzeylerinde artış izlendi. Kloropirifosun 1µM'lık dozuna kıyasla 10µM'lık dozda CD45 ve CD23 te anlamlı bir azalma, total T lenfosit CD4+CD26+ T lenfositlerinde artış izlenmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada da kloropirifosa kronik olarak maruz kalan ve sağlık problemleri olan 29 kişilik bir grupta kohort periferik lenfosit fenotipleri, otoantikor üretimi ve mitojenezis yönünden araştırılmıştır. Bu olgularda yaş ve cinsiyet farkı olmaksızın, CD5+ fenotipinde azalma, CD28+ fenotipinde artma, KonA ile indüklenmiş mitojeneziste azalma ve otoantikor üretiminde artış belirlenmiştir (44).

Endosulfanın *in vitro* ortamda lenfositler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (35). Bu immünotoksik etkiler koyun lenfositlerinde de “lökosit göç inhibisyon metodu” kullanılarak gösterilmiştir (36). Balık hücrelerinde flow sitometre metodu ve FITC floresan boyası kullanılarak yapılan bir çalışmada ise endosulfanın fagositik aktiviteyi azalttığı görülmüştür (37). Ayrıca başka bir çalışmada, endosulfanın insan böbrek kanser hücre kültüründe östrojen reseptörü aracılığıyla sitokin sinyal iletisini etkileyebileceği gösterilmiştir (86). Endosulfanın östrojenik etkiye sahip bir endokrin bozucu olduğu bildirilmiştir (87). Çalışmamızda ise endosulfan etkisindeki T lenfosit hücrelerinin flow sitometrik değerlendirilmelerinde istatistiksel olarak total T hücrelerde (CD4 ve CD8) de anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Ancak CD45 yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma, B lenfositlerde yüzey ekspresyonu IgE reseptörü CD23 te ise anlamlı bir artış söz konusudur. Yine doza bağımlı olarak gruplar arası farkı incelediğimizde endosulfanın 1µM'lık dozuna kıyasla 10µM'lık dozunda CD45 yüzdelerinde anlamlı bir azalma izlendi.

**Sonuç olarak;** B hücrelerinde ki CD23 ekspresyonunda ve Th1 hücrelerinde ki anlamlı artış PCB' lere maruz kalan bireylerde aşırı duyarlılığa neden olabilir. Treg hücrelerden CD4+25' te izlenen artış ise hücrel immün cevabın baskılanmasına neden olabilir ki TGF-β' da saptadığımız yükselme bu veriye paralellik göstermektedir. Pestisitlerin ve özellikle de kloropirifosun total hücre kültüründe CD4+CD30 oranını, CD4+25'i ve yine zamana bağımlı olarak IFN-γ seviyesinde yaptığı artışla, Th2 polarizasyonunu baskılayıcı bir etki gösterdi.

Bütün bu bulgularımız PCB' lerin ve pestisitlerin immün cevabı gerek hücresel gerekse humoral yönünden ve sitokin yanıtı bakımında değiştirebilirler. İmmün cevabın PCB' lerin Th1 yönünde, pestisitlerin ise Th2 yönünde değişimine neden olabileceğini göstermektedir. Bu konuda daha ileri bilgi, hücre fonksiyon çalışmalarıyla belirlenebilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Carpenter DO. (1998). Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health*. 11: 291-303.
2. Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN. (2002). Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol*. 5: 246-253.
3. Abramowicz DA. (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. *Crit Rev Biotechnology*. 10: 241-251.
4. Xing Y, Lu Y, Dawson RW, et al. (2005). A spatial temporal assessment of pollution from PCBs in China. *Chemosphere*, 60: 731-9.
5. Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, et al. (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere*. 28: 1049-1067.
6. Altman L, Lilienthal H, Hany J, Wiegand H. (1998). Inhibition of long-term potentiation in developing rat visual cortex but not hippocampus by in utero exposure to polychlorinated biphenyls. *Brain Res Dev Brain Res*. 110: 250-260.
7. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383: 787-793.
8. Altıntaş A, Kantarcı O, Şiva A. (1995). Multipl sklerozda sitokinlerin rolü. *Türk Nöral Derg*. 4: 167-171.
9. Altmann L, Lilienthal H, Hany J, Wiegand H. (1998). Inhibition of long-term potentiation in developing rat visual cortex but not hippocampus by in utero exposure to polychlorinated biphenyls. *Brain Res Dev Brain Res*. 110: 257-260.
10. Anderson G, Owen JJ, Moore NC, Jenkinson EJ. (1994). Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro. *J Exp. Med*. 179: 2027-2031.
11. Anon. (2004). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı. Erişim: (<http://lokman.cu.edu.tr/dermatologyegitim/age20021007.htm>). Erişim Tarihi: 20.04.2004.
12. Anon. (2014). Fluo calcium indicators. Erişim: (<http://www.probes.com/servlets>). Erişim Tarihi: 04.09.2014.
13. Anon. (2014). Lymphatic System. Erişim: (<http://www.manavata.org>). Erişim Tarihi: 10.09.2014.
14. Çok I, Görücü E, Şatıroğlu MH, Demircigil GC. (2003). Polychlorinated biphenyl levels in human milk samples from Turkish mothers. *Bull Environ Contam Toxicol*. 70: 41-45.
15. Çok I, Şatıroğlu MH. (2004). Polychlorinated biphenyl levels in adipose tissue of primiparous women in Turkey. *Environ Int*. 30: 7-10.
16. Sandal S. Poli Klorlu Bifenillerin Fare Timus Hücre Kültüründe İmmünobiyolojik Etkileri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004.

17. Anon. (2014). Propidium iodide nucleic acid stain. Erişim: (<http://www.probes.com/servlets>). Erişim Tarihi: 04.08.2014.
18. EPA. Erişim: (<http://www.epa.gov/pesticides/>). Erişim Tarihi: 26.09.2014.
19. Exttoxnet, Movement of pesticides in the environment. Erişim: (<http://exttoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm>). Erişim Tarihi: 08. 05. 2014.
20. Exttoxnet, Movement of pesticides in the environment. Erişim: (<http://exttoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm>). Erişim Tarihi: 08. 05. 2014
21. Delen N, Kınay P, Yıldız F, Yıldız M, Altınok H, Uçkun Z. (2010). Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşımın olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongre, Ankara.
22. Beyond Pesticides, California's Pesticide Use Declined, Yet Millions of Pounds of Toxic Pesticides Continue, (2010).
23. Vallack HW, Bakker DJ, Brandt E et al. (1998). Controlling persistent organic pollutants-what's next? *Environ Toxicol Pharmacol*, 6: 143-175.
24. Carpenter DO. (1998). Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Healt*. 11: 291-303.
25. Turgut C. (2003). The contamination with organochlorine pesticides and heavy metals in surface water in Kucuk Menderes River in Turkey, 2000-2002. *Environ Int*, 29: 29-32.
26. Erdogru O, Covaci A, Kurtul N and Schepens P. (2004). Levels of organohalogenated persistent pollutants in human milk from Kahramanmaraş region, Turkey. *Environ Int*, 30: 659-666.
27. Çok I, Görücü E, Şatroğlu MH, Demircigil GC. (2003). Polychlorinated biphenyl levels in human milk samples from Turkish mothers. *Bull Environ Contam Toxicol*. 70: 41-45.
28. Çok İ ve Öztok U. (2003). Çevremizdeki Kimyasalların Üreme Sistemi Üzerine Etkileri. *Sağlık ve Toplum Dergisi*, 3: 9-18.
29. Colborn T. (2004). Commentary: setting aside tradition when dealing with endocrine disruptors. *ILAR Journal*, 45: 394-400.
30. Vallack HW, Bakker DJ, Brandt E et al. (1998). Controlling persistent organic pollutants-what's next? *Environ Toxicol Pharmacol*, 6: 143-175
31. Wade MG, Foster WG, Younglai EV, et al. (2002). Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci*, 67: 43.
32. Banerjee BD, Hussain QZ. (1986). Effect of sub-chronic endosulfan exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Arch Toxicol*, 59: 279-84.
33. Akay MT, Ozmen G, Elcuman EA. (1999). Effects of combinations of endosulfan, dimethoate and carbaryl on immune and hematological parameters of rats. *Vet Hum Toxicol*, 41: 296-9.

34. Wade MG, Foster WG, Younglai EV, et al. (2002). Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci*, 67: 131.
35. Jamil K, Shaik AP, Mahboob M, Krishna D. (2004). Effect of organophosphorus and organochlorine pesticides (monochrotophos, chlorpyrifos, dimethoate, and endosulfan) on human lymphocytes in-vitro. *Drug Chem Toxicol*, 27: 133-44.
36. Pistl J, Kovalkovicova N, Kacmar P, Kusova I, Mikula I, Sutiakova I. (2001). Effect of endosulfan on peripheral sheep leukocytes in vitro. *Vet Hum Toxicol*, 43: 78-82.
37. Harford AJ, O'Halloran K, Wright PF. (2005). The effects of in vitro pesticide exposures on phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquat Toxicol*, 30; 75: 330-42.
38. Ayub S, Verma J, Das N. (2003). Effect of endosulfan and malathion on lipid peroxidation, nitrite and TNF-alpha release by rat peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol*, 3: 1819-28.
39. Sekine Y, Yamamoto T, Yumioka T, Imoto S, Kojima H, Matsuda T. (2004). Cross-talk between endocrine-disrupting chemicals and cytokine signaling through estrogen receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 315: 692-8.
40. Safe S. (2004). Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicol*, 205: 3-10.
41. Delen N, Durmuşoğlu E, Günçan A, Güngör N, Turgut C ve Burçak A. (2005). Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, Ankara, pp. 1-21.
42. Galloway T and Handy R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12: 345-63.
43. Blakley BR, Yole MJ, Brousseau P, Boermans H, Fournier M. (1999). Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. *Vet Hum Toxicol*, 41: 140-4.
44. Thrasher JD, Heuser G, Broughton A. (2002). Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Arch Environ Health* 57: 181-7.
45. Thrasher JD, Madison R, Broughton A. (1993). Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: preliminary observations. *Arch Environ Health*, 48: 89-93.
46. Navarro HA, Basta PV, Seidler FJ, Slotkin TA. (2001). Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect? *Brain Res Dev Brain Res*, 130: 249-52.
47. Chang KJ, Hsieh KH, Lee TP, Tang SY, Tung TC. (1981). Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. Determination of lymphocyte subpopulations. *Toxicol Appl Pharmacol*. 61: 58-63.
48. Thomas PT, Fatih RE. (1985). Adult and perinatal immunotoxicity induced by halogenated aromatic hydrocarbons. In: Dean J, Luster MI, Munson AE, Amos H. (Eds). *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Raven Press, NY, USA. 305-313.

49. Vos JG, Bolksma N, Osterhaus AD, van Loveren H, Wester PW. (1996). Comparative sensitivity of different species to environmental chemical-induced immunotoxicity. In: *Modulators of Immune Responses: The Evolutionary Trail*. SOS Publications. Fair Haven, NJ. USA. Sayfa: 341-347, 351-364.
50. Kerkvliet NI, Steppan LB, Smith BB, Youngberg JA, Henderson MC, Buhler DR. (1990). Role of the Ah locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57B1/6 mice congenic at the Ah locus. *Fundam. Appl Toxicol.* 14: 532-541.
51. Silkworth JB, Antrim L, Kaminsky LS. (1984). Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicol Appl Pharm.* 75: 156-165.
52. Davis D and Safe S. (1990). Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists. *Toxicology.* 63: 97-111
53. Aulwurm UR, Brand KA. (2000). Increased formation of reactive oxygen species due to glucose depletion in primary cultures of rat thymocytes inhibits proliferation. *Eur J Biochem.* 267: 5693-5698.
54. Anderson HA, Falk C, Hanrahan L, et al. (1998). Profiles of Great Lakes critical pollutants: a sentinel analysis of human blood and urine. *The Great Lakes Consortium. Environ Health Perspect.* 106: 279-289.
55. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, et al. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein. *Science.* 298: 1395-1401.
56. Apostoli P, Mangili A, Carasi S, Manno M. (2003). Relationship between PCBs in blood and D-glucaric acid in urine. *Toxicol Lett.* 144: 17-26.
57. Espandiari P, Glauert HP, Lehmler HJ, Lee EY, Srinivasan C, Robertson LW. (2003). Polychlorinated biphenyls as initiators in liver carcinogenesis resistant hepatocyte model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 186: 55-62.
58. Van Larebeke N, Hens L, Schepens P, et al. (2001). The Belgian PCB and dioxin incident of exposure data and potential impact on health. *Environ Health Pers.* 109: 265-273.
59. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. (2001). The CD classification of hematopoietic cell surface markers. *Medical Immunology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division; 761-762.
60. Romagnani BS. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 85: 9-18.
61. Bulut V. (2004). İnfeksiyon hastalıklarında Th1-Th2 yanıtı. Deniz G, Saruhan-Direskeneli G (eds). *İmmünolojide Gelişmeler-IV*. Erka Matbaacılık, İstanbul: 157-167.
62. O'Garra A and Murphy K. (1996). Role of cytokine in development of Th1 and Th2 cells. *Chem Immunol*, 63: 1-13.

63. Işıtmangil G, Annayev B. (2002). Allerjide immünolojik kavramlar. Aktüel Tıp Dergisi, 7: 1-5.
64. Male D, Brostoff J, Roth BD, Roitt I. İmmünoloji. İmir T (Çeviren). 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2008: 170.
65. Kalaycı AÖ. (2000). Astımda immünopatolojik mekanizmalar. Türkiye Klinikleri Allerji-Astım Astım Özel Sayısı 2(2): 67-72.
66. Aktaş E. (2004). Lökosit yüzey molekülleri. Deniz G, Yılmaz T, Yıllar G (eds). Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı. Özlem Grafik Matbaacılık, İstanbul: 39.
67. Sakaguchi S, Sakaguchi N. (2005). Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. Int Rev Immunol, 24: 211-26.
68. Nogueira AJM, Pinto PL, Loureiro V, et al. (1998). Soluble CD30, dehydroepiandrosterone sulfate and dehydroepiandrosterone in atopic and non atopic children. Allerg Immunol (Paris), 30: 3-8.
69. Aybay C. (1999). İmmünolojik teknikler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Ustaçelebi Ş. (Ed), Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, s: 325-336.
70. Boztosun A, Kumru S, Gödekmerdan A. (2004). Rekürren spontan abortuslarda lenfosit subgrupları ve sitokinlerin rolünün araştırılması. F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi 18(3): 147-155.
71. Sandal S. (2004) Poliklorlu Bifenillerin Fare Timus Hücre Kültürlerinde İmmünobiyojik Etkileri. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004.
72. Sandal S, Yılmaz B, Godekmerdan A, Kelestimur H, Carperter DO. (2005) Effects of PCBs 52 and 77 on Th1/Th2 balance in mouse thymocyte cell cultures. Immunopharmacol Immunotoxicol. 27(4): 601-13.
73. Sandal S, Yılmaz B, Carperter DO. (2008). Genotoxic effects of PCB 52 and PCB 77 on cultured human peripheral lymphocytes. Mutat Res.: 30: 654(1): 88-92.
74. Alonso-Sánchez JA, Aparicio PL, Recio NM, Albarsanz PAM. (2003). Apoptosis mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. Toxicology Letters: 144: 337-349.
75. Storelli MM, Storelli A, D' Addabbo R, Barone G, Marcotrigiano GO. (2004). Polychlorinated biphenyl residues in deep-sea fish from Mediterranean Sea. Environ Int. 30: 343-349.
76. Safe S. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. Crit Rev Toxicol. 24: 87-149.
77. Fujimaki H, Nohara K, Kobayashi T, Suzuki K, Eguchi-Kasai K, Tsukumo S, Kijima M, Tohyama C. (2002). Effect of a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice. Toxicol Sci. 66:117-124.

78. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lippincott Görsel Anlatımlı Çalışma Kitapları: İmmünoloji, Günnur D, Erten G, Camcıoğlu Y (Çevirenler), İstanbul: Nobel, 2013.
79. Sungur M, Guven M. (2001) Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care*: 5: 211-5.
80. Kwong TC. (2002). Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit*: 24:144-9.
81. Johnson MK, Jacobsen D, Meredith TJ, et al. (2000). Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. *Emerg Med*: 12: 22-37.
82. von Boehmer H. (1992) Thymic selection: a matter of life and death. *Immunol Today*: 11: 454-58.
83. Romagnani S. (2000). T-cell alt grups (Th1 versus Th2). *Annals Of Allergy Asthma and Immunology*: 85: 9-18.
84. Nagayama J, Tsuji H, Iida T, Nakagawa R, Matsueda T, Hirakawa H, Yanagawa T, Fukushige J, Watanabe T. (2007). Immunologic effects of perinatal exposure to dioxins, PCBs and organochlorine pesticides in Japanese infants. *Chemosphere* 67: S393–S398.
85. Nakao K, Nagake Y, Okamoto A, Ichikawa H, Yamamura M, Makino H (2001). Serum: Levels of Soluble CD26 and CD30 in Patients on Hemodialysis. *Nephron*: 91: 215–221.
86. Brown JF, Bedard DL, Brennan MJ, Carnahan JC, Feng H, Wanger RE. (1987). Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediment. *Science*. 236: 709-711.
87. Brown AP, Ganey PE. (1995). Neutrophil degranulation and superoxide production induced by polychlorinated biphenyls are calcium dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*. 131: 198-205.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

08.01.1980 yılında Elazığ' da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 1998 yılında Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim ve 2002 yılında Biyolog olarak mezun oldum. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Araştırma Hastanesi İmmünoloji Bölümün de Biyolog olarak göreve başladım. 2003 yılının sonbahar döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2005 te Ankara' ya taşındığımdan eğitimimi yarım bırakmak zorunda kaldım. 2013 yılının sonbahar döneminde 2008 öğrenci af programından faydalanarak yüksek lisans programına yeniden başladım. Halen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi' nde Biyolog olarak çalışmaktayım. Bir kız çocuk annesiyim.