

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEYMA APARI

NEONİKOTİNOİD GRUBU PESTİSİTLERİN ÜREME
TOKSİSİTESİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRMESİ: THİAKLOPRİD
ÖRNEĞİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ŞEYMA APARI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL.
ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. MAHMUT FIRAT KENANOĞLU

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL- 2024

İSTANBUL-
2024

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NEONİKOTİNOİD GRUBU PESTİSİTLERİN ÜREME TOKSİSİTESİNİN İN
VİTRO DEĞERLENDİRMESİ: THİAKLOPRİD ÖRNEĞİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ŞEYMA APARI

DANIŞMAN

Doç. Dr. MAHMUT FIRAT KENANOĞLU

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL- 2024

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, tezli yüksek lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi . Şeyma APARI tarafından Doç. Dr. MAHMUT FIRAT KENANOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "NEONİKOTİNOİD GRUBU PESTİSİTLERİN ÜREME TOKSİSİTESİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRMESİ: THİAKLOPRİD ÖRNEĞİ " başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 16 /08/2024 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel ÖZDEN

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Toksikoloji AbD

Jüri-Danışman

Doç. Dr. Mahmut Fırat KENANOĞLU

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Toksikoloji AbD

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Merve ARICI

İstinye Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Toksikoloji AbD

İTHAF

Toplumun yararına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Her konuda benimle sabırla ve anlayıőla ilgilenen, tez çalıőmamda emeğinin karőılıęını ödeyemeyeceğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Mahmut Fırat KENANOğLU'na teşekkür ederim. Benden maddi manevi desteklerini esirgemedikleri için canım annem Jale Kılıç ve sevgili eőim Yaőar Aparı'ya teşekkür ediyorum. Ayrıca canım kızım Azra Aparı'ya hayatımda olduğu için teşekkür ederim.

Bu alıőma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39938

İÇİNDEKİLER

BEYAN	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF	ii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLOLAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pestisitler	4
2.1.1. İnsektisidler	5
2.1.2. Thiacloprid	7
2.2. Erkek Üreme Sistemi.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Kullanılan Aletler ve Gereçler	11
3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	11
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler.....	13
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	14
3.2. Hücre Kültürü.....	15
3.1.4. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği.....	15
3.1.5. Hücre Dizilerinin Temini ve Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	15
3.1.6. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Edilmesi	16
3.1.7. Pasajlama.....	16
3.1.8. Hücrelerin Sayılması	17
3.2. Sitotoksosite Testleri	18
3.2.1. MTT.....	18
3.2.2. NRU TESTİ.....	19

3.3. GENOTOKSİSİTE COMET ile değerlendirilmesi.....	20
3.4. Apoptoz İndükleme	22
3.5. Oksidatif Hasar Oluşturma	22
3.5.1. ROS Testi	23
3.5.2. MDA Testi.....	23
3.5.3. GSH Tayini.....	24
3.5.4. T-SOD Değerlendirmesi.....	24
3.6. TESTOSTERON Ölçümü	25
3.7. Protein Miktar Tayini	25
3.8. İstatiksel Anlamlılık Testi	26
4. BULGULAR	27
4.1. TM3 VE TM4 Hücre dizilerinde sitotoksosite değerlendirilmesi.....	27
4.1.1. MTT testi ile değerlendirilmesi.....	27
4.1.2. NRU testi ile değerlendirilmesi	28
4.2. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Genotoksosite değerlendirilmesi	30
4.3. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Apoptoz indükleme değerlendirilmesi..	32
4.4. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Oksidatif Hasar oluşturma potansiyeli değerlendirilmesi.....	34
4.4.1. ROS indükleme potansiyeli değerlendirilmesi.....	34
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	43
KAYNAKLAR.....	44
HAM VERİLER.....	49
FORMLAR.....	50
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	51

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3. 1: Kullanılan Alet ve Cihazlar	11
Tablo 3. 2: Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	13
Tablo 3. 3: Kullanılan Sarf Malzemeler	14
Tablo 4. 1: TM3 ve TM4 Hücrelerinde NRU ve MTT testler ile sitotoksosite değerlendirilmesi.....	30
Tablo 4. 2: TM3 ve TM4 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli.	32
Tablo 4. 3: TM3 ve TM4 apoptoz indüklenme potansiyeli.....	32
Tablo 4. 4: Thioclopid'in TM3 ve TM4 hücre dizilerinde ROS indüklenme potansiyeli	34
Tablo 4. 6: Thioclopid'in farklı konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılan TM4 ve TM3 hücrelerindeki oksidatif stres indüklenmesi	37
Tablo 4. 7: Thioclopid'e maruz kalan TM3 hücresinde testosteron miktarı.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4. 1: TM3 Hücre hattında MTT testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi.....	28
Şekil 4. 2: TM4 Hücre hattında MTT testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi.....	28
Şekil 4. 3: TM3 Hücre hattında NRU testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi.....	29
Şekil 4. 4: TM4 Hücre hattında NRU testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi.....	29
Şekil 4. 5: TM3 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli * $p \leq 0,05$	31
Şekil 4. 6: TM4 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli * $p \leq 0,05$	31
Şekil 4. 7: TM3 hücrelerinin apoptoz indüklenme potansiyeli.....	33
Şekil 4. 8: TM4 hücrelerinin apoptoz indüklenme potansiyeli.....	33
Şekil 4. 9: Thiocloprid'in TM3 hücrelerinde ROS oluşturma potansiyeli.....	35
Şekil 4. 10: Thiocloprid'in TM4 hücrelerinde ROS oluşturma potansiyeli.....	35
Şekil 4. 11: MDA standart eğrisi.....	36
Şekil 4. 12: GSH standart eğrisi	36
Şekil 4. 13: T-SOD standart eğrisi	37
Şekil 4. 14: Testosteron tayini standart eğrisi	38

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
EPA	Environmental Protection Agency
MRL	Maksimum Kalıntı Limitleri
DDT	Dikloro Difenil Trikloroetan
AB	Avrupa Birliği



ÖZET

Aparı, Ş. (2024). Neonicotinoid grubu pestisitlerin üreme toksisitesinin *in vitro* değerlendirmesi: Thiacloprid örneği. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Pestisitler, tarım ürünlerinde istenmeyen organizmaları yok etmede kullanılan doğal ve sentetik bileşiklerdir. Ancak bitkiyi zararlılara karşı korurken hedefi olmayan organizmalara da etki gösterebilir. Neonicotinoid grubunda yer alan ve sıklıkla kullanılan Thiacloprid'in üreme hücrelerini üzerine etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu amaçla fare Leydig (TM3) ve Sertoli (TM4) hücreleri üzerinde sitotoksosite, genotoksosite, apoptoz ve oksidatif stres indüklemeye potansiyeli değerlendirilmiştir. Ayrıca TM3 hücrelerde testosteron seviyeleri ölçülmüştür. 24 saatlik maruziyet sonucu sitotoksik etkisi değerleri NRU sonuçlarına göre TM3 hücrelerinde IC_{50} 1795,82 μM 'dir TM4 hücrelerinde ise IC_{50} 984,25 μM 'tir, MTT testine göre IC_{50} değerleri TM3 ve TM4 hücrelerinde, sırayla 336,7 ve 1761,1 μM . Comet testi sonucuna göre kuyruktaki DNA yoğunluğu ortalama TM3 hücrelerinde 1,25-5,6 kat arasında iken TM4 hücrelerinde 7,94-9,69 kat arasındadır. Apoptoz indüklemeye sonucunda TM3 hücrelerinde 500 μM konsantrasyonunda 1,85 kat artış, TM4 hücrelerinde 500 μM konsantrasyonunda 2,16 kat artış gözlenmiştir. Oksidatif hasar oluşturma değerlendirmesinde, ROS seviyeleri anlamlı bir şekilde artmamıştır. Bununla birlikte MDA, GSH ve SOD seviyeleri anlamlı fakat doza bağımlı olmayan artış ve azalışlar göstermiştir. TM3 hücrelerindeki testosteron seviyeleri ise maruziyet dozuna bağlı olarak azalma göstermiştir, en yüksek maruziyet grubunda (500 μM) yaklaşık %33,3 azalma tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre Thiacloprid erkek üreme sistemine bir risk oluşturduğunu göstermektedir; Thiacloprid ve diğer neonicotinoid kullanımında gerekli önemlerin alınmasına dikkat çekileceğine inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Thiacloprid, TM3 ve TM4 hücreleri, *In vitro* toksisite, neonicotinoid, pestisit

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39938

ABSTRACT

Apari, Ş. (2024). *In vitro* evaluation of reproductive toxicity of neonicotinoid pesticides: Example of Thiacloprid. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. İstanbul.

Pesticides are natural and synthetic compounds used to eliminate unwanted organisms in agricultural products. Thiacloprid is one of frequently used neonicotinoid pesticides, in the present thesis it's *in vitro* toxicity in mouse Leydig (TM3) and Sertoli (TM4) reproductive cells has been investigated. For this purpose, the cytotoxicity, genotoxicity, apoptosis, and oxidative stress induction potential were evaluated. Additionally, testosterone levels were measured in TM3 cells. After 24 hours of exposure, the cytotoxic effect values according to NRU results were IC₅₀ 1795.82 µM in TM3 cells and 984.25 µM in TM4 cells. According to the MTT assay, the IC₅₀ values were 336.7 µM and 1761.1 µM in TM3 and TM4 cells, respectively. The Comet assay results showed that the DNA intensity in the tail was between 1.25- and 5.6-fold in TM3 cells and between 7.94- and 9.69- fold in TM4 cells, compared to the control groups. Upon induction of apoptosis, a 1.85-fold increase was observed in TM3 cells at a concentration of 500 µM, and a 2.16-fold increase was observed in TM4 cells at the same concentration. In the assessment of oxidative damage, ROS levels did not increase significantly. However, MDA, GSH, and SOD levels showed significant but non-dose-dependent increases and decreases. Testosterone levels in TM3 cells decreased in a dose-dependent manner, with approximately a 33.3% reduction in the highest exposure group (500 µM). These results indicate that Thiacloprid poses a risk to the male reproductive system; it is believed that necessary precautions should be taken in the use of Thiacloprid and other neonicotinoids.

Keywords: Thiacloprid, TM3 and TM4 cells, *In vitro* toxicity, neonicotinoid, pesticide

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 39938

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nüfusun artmasıyla ürün verimliliği konusu daha çok önem kazanmıştır. Bitkileri zararlılara karşı korumak amacıyla kullanılan en yaygın yöntem pestisit uygulamasıdır. EPA (Environmental Protection Agency) pestisitleri; herhangi bir zararlının önlenmesi, yok edilmesi, püskürtülmesi, zararın hafifletmesi için kullanılan ayrıca bitki düzenleyici, yaprak kurutucu ya da dökücü olarak kullanılan ve nitrojen stabilizatörü olan madde veya madde karışımları olarak tanımlar (EPA, 2024). EPA pestisit satışına başlamadan önce insan sağlığını ve çevreyi korumaya yönelik güvenlik standartlarını karşıladığından emin olmak için bunları kapsamlı bir şekilde değerlendirir. Pestisit satışına sunulması için kimliği, potansiyel olumsuz etkileri, çevreye olan etkisini bilimsel veri olarak ortaya koymalıdır. Bu veriler bir pestisit belirli hedef dışı organizmalara ve nesli tükenmekte olan türlere zarar verip vermeyeceğini değerlendirmeye yardımcı olmaktadır (EPA, 2024). Ortalama pestisit kullanımı son 10 yılda 1990'lı yıllara oranla %50 artmıştır. 2020 yılında toplam pestisit satışı 7,2 milyon ton olmuştur. Bunun değeri 41,1 milyar ABD dolarıdır. Toplam pestisit ticareti miktarı 2020'de ise yüzde 30 arttı; bunun sebebi büyük çoğunlukla 2019'dan 2020'ye 4,0'dan 8,7 milyon tona çıkan dezenfektan ticareti olabilir. (FAO, 2022). Türkiye'de toplam tarım ilacı kullanımı 2022 yılında, 2021 yılına göre 4,5% artmış ve 55.374 ton'a yükselmiştir. Tarım ilacını en fazla kullanan ilk 5 ilimiz; toplam kullanımın 7,7%'si ile Antalya (4.272 ton), 7,6%'sı ile Manisa (4.213 ton), 7,2%'si ile Mersin (3.985 ton), 5,9%'u ile Adana (3.276 ton), ve 4,1%'i ile Malatya (2.280 ton) olmuştur. (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023). Pestisitler doğru uygulandığında ve doğru dozda kullanıldığında faydası oldukça fazladır. Fakat yüksek dozda ve kontrolsüz kullanıldığında hem insan sağlığına hem çevreye olumsuz etki etmektedir. Vücuda genelde deri, solunum ve ağız yoluyla girer. Bu giriş pestisitlerle canlıların teması, pestisitlerin üretimi sırasında, taşıma esnasında, depolama yapılırken ve ilaç kalıntısı olan ürünlerin vücuda girmesiyle olmaktadır. (Erdoğan, 2010). Son yıllarda yapılan araştırmalara göre kronik olarak sinir sistemini olumsuz etkiler ve endokrin bozucu olarak etki gösterir. Ayrıca karaciğer, böbrek toksisitesi ve kansere sebebiyet vermektedir (Özpolat Çakar, 2020). Akut olarak aşırı terleme, titreme, hafıza kaybı, cilt rahatsızlıkları gibi etki göstermektedir (PAN-Germany, 2012). 1995 yılında Dünya sağlık örgütünün (WHO) yayınladığı rapora göre, dünyada her yıl ortalama 1 milyon insan pestisitler nedeniyle zehirlenmektedir ve

20.000 insan ölmektedir. Ayrıca pestisitlerin parçalanması sonucu oluşan metabolitleri de insanları zehirleyebilmektedir (Erdoğan, 2010). Ürünlerde bulunabilecek maksimum kalıntı limitleri (MRL) bulunmaktadır. Ayrıca her ülkenin kendisine ait MRL listesi vardır (Tiryaki, 2010). 2002'den sonra pestisit tüketiminin düşmesi, tarımda bu konu hakkındaki öneminin anlaşıldığının ve uygulamaya konulduğunun göstergesidir (Altıkat, 2009). Organoklorlu pestisitlerin yasaklanmasından sonra alternatif olarak çevre için daha az risk taşıyan neonicotinoidler tercih edilmeye başlanmıştır. Neonicotinoid grubuna dahil olan insektisitler nikotin türevleridir. N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran, ve klotianidin) ve N-siyanoaminidler (asetamiprid ve tiyakloprid) olmak üzere 2'ye ayrılır. Neonicotinoidler, memelilerde ve böceklerde post-sinaptik membran üzerinde nikotinic asetilkolin reseptörüne bağlanırlar ve agonist olarak etki gösterirler. Neonicotinoid grubu insektisitler özellikle DNA hasarı, kardeş kromatid değişimi, mikroçekirdek oluşumu, kromozal anormallikler, DNA kırıklarına neden olur. Yapılan çalışmalar neonicotinoidlerin oluşturduğu DNA hasarının sinir sistemi, solunum sistemi, üreme ve bağışıklık sistemi üzerine negatif etkisine, tümörlerin gelişimine sebep olduğunu da göstermiştir. Thiacloprid karsinojen maddedir ve farelerde yumurtalık tümörüne sebep olduğu belirlenmiştir (Kılınç, 2016). Thiacloprid, Neonicotinoid grubuna ait insektisittir. Plazmada en yüksek konsantrasyona maruziyetten yaklaşık 3-4 saat sonra ulaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda Thiacloprid'in; akciğer, karaciğer, böbrek, tiroid, dalak ve deri gibi organlara yayıldığı tespit edilmiştir. Oksidatif stresin indüklendiği ve buna bağlı olarak testis hücre organellerinde işlev bozukluğu ve erkek infertilitesinin indüklemeye potansiyeli olduğu görülmüştür (Elsharkawy, 2021). Thiacloprid'in tarımsal mücadelede faydasının olmasına rağmen karsinojenik risk taşımasının yanı sıra üreme sistemi ve hormonal sistem üzerine de kronik toksik etkiler oluşturmaktadır. Thiacloprid'e insanların maruziyeti ve bu maruziyetin kronik olma durumu, maruziyetin miktarı ve buna bağlı insan sağlığı üzerindeki olumsuz etki potansiyeli gibi konular hala belirsizliğini korumaktadır. Günümüzde olumsuz etki potansiyeli fazla olduğu ortaya çıkan ve insanların dikkatini çeken Thiacloprid'in daha fazla çalışmalarla araştırılması gerekli görünmektedir. Thiacloprid maddesinin maruziyetin olası etkileri, insan TM3 ve TM4 hücre dizileri üzerinde *in vitro* olarak değerlendirilecek ve olası sitotoksik, genotoksik, oksidatif ve apoptotik hasar oluşumu araştırılacaktır.

Vücuttaki çeşitli organların, hücrelerin ve sistemlerin üzerine toksik etki olasılığı olan Thiacloprid'in, günümüzdeki kullanımının artmış olmasının yansırı yan etki profili ile ilgili araştırmaların yeteri kadar olamaması da ortaya çıkacak sonuçların insan sağlığı açısından bu kimyasalın olası toksik etkisinden korunmak için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Bu nedenle, yapılan tez çalışması sonucu ortaya çıkacak sonuçlar Thiacloprid'in maruziyetlerine karşı gerekli tedbirlerin alınmasının önemini vurgulamak açısından önemli olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

İnsan nüfusu ile orantılı olarak beslenme ihtiyacı artmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak için tarımsal ürünlerin verimini artırmak amacıyla güncel tarım tekniklerinin ve yardımcı maddelerin kullanılması gerekmektedir. Tarım alanındaki verimi arttırmak ve gıda maddelerinin dayanıklılık sürelerini uzatabilmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri kimyasal mücadele yöntemidir (Akdoğan, 2012). Kimyasal mücadelenin temelini pestisit adı verilen kimyasal maddeler oluşturur.

Pestisitler tarım ürünlerine karşı zararlıları kontrol altına almak amacıyla kullanılan toksik maddelerdir. Zararlı organizmalardan koruyarak ürün verimliliğini ve kalitesini artırır, hastalıkların kontrolünü sağlayarak maddi zarar olasılığına engel olur. Hızlı etkinlik göstermesi ve uygulanmasının kolay olması pestisit kullanımının çok tercih edilme sebebidir. 1940'lı yıllardan beri kullanılan pestisitler tarımsal üretimde artışa katkı sağlamıştır. Ürün zararlılarına karşı tarımsal mücadele yöntemleri arasında, kimyasal madde kullanımı %95'in üzerinde bir paya sahiptir ve bugün de popülerliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerin kalitesi ve verimliliğinde %60 oranda düşüklük meydana gelmektedir. Bu nedenle, zararlı organizmaları kontrol altına almak amacıyla bitki koruma ürünlerinin kullanılması büyük önem arz etmektedir (Tiryaki, 2010). Pestisitler tarımda kullanılmasının yanı sıra ayrıca bahçecilik, ormancılık, gıda saklanması gibi alanlarda da kullanılır. Ülkemizde 2020 yılında toplam tarım ilacı kullanımı, 2019 yılına % 4,6 oranla artmıştır ve toplam 53.672 ton'a yükselmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023). En çok kullanılan ürün grubu fungusitlerdir. 2020 yılında tarım ilacı kullanımının %38,4'ünü fungusitler, %24,7'sini herbisitler, %23,0'ını insektisitler, %4,1'ini akarisitler (akar öldürücüler), %0,5'ini rodentisitler (kemirgen öldürücüler) ve %9,3'ünü diğer gruplar oluşturmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2023).

Etki ettiği organizmaya göre bakterisit, fungusit, herbisit, insektisit, mollusit, nemasit ve veteriner ürünleri olarak sınıflandırılır. İdeal olarak ucuz, kolay uygulanabilir, insan sağlığına zararsız, yanıcı ve patlayıcı olmayan, toksik olmayan maddeye kolayca dönüşebilmeli ve hedef canlıya spesifik etkili olmalıdır (Güler, 1997).

Pestisitler hava yoluyla, su yoluyla, toprak kirliliğine bağlı olarak ve yiyeceklerdeki kalıntılar ile yayılır (Güler, 1997). Deri, göz, solunum yolu ve gastrointestinal yolla vücuda girebilmektedir. Genellikle yağda çözünen pestisitler çevrede uzun yıllar çözünmeden kalabilir (Babayiğit vd, 2014). Son yıllarda pestisitlerin zararları ile ilgili araştırmalar oldukça artmıştır.

Pestisitlerin kullanımı bitkiye zararlı organizmaları etkilemenin yanı sıra hedefi olmayan organizmalara da etki eder. Bu organizmaların arasında hayvanlar, diğer bitkiler ve insanlar bulunur. İnsanlarda etkisi akut ve kronik toksisite olarak iki şekilde adlandırılır. Akut toksisitenin en belirgin etkileri sinir sistemine etkisi sonucu; yorgunluk, konsantrasyonda azalma, hafıza kaybı, titreme, panik atak ve depresyon yer alır. Deriye maruziyeti sonucu; deri rahatsızlığı, döküntüler vardır. Diğer etkiler ise zayıflık, aşırı terleme, baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, aşırı terleme, görme bozukluğudur (PAN-Germany, 2012).

Kronik toksisite için yapılan çalışmalarda ise pestisitlere kronik maruz kalımının DNA hasarı ile ilişkili olduğu, organofosfor bileşikler karışımına mesleki olarak maruz kalmanın DNA hasarına, AChE aktivitesinde düşmeye, böbrek ve karaciğer toksisitesine neden olabileceği gösterilmiştir (Özpolat Çakar, 2020). Ayrıca 1940'lerden 1970'li yıllara kadar yaygın olarak kullanılan diklorodifeniltrikloroetan (DDT) kontamine olan yiyecekleri yiyen canlılara da zarar verdiği açığa çıkınca kullanımı yasaklanmıştır.

2.1.1. İnsektisidler

Pestisitler içinde yaygın olarak kullanılan gruptur. İnsektisidler; organoklorlu insektisitler, organofosforlu insektisitler, karbamatlar, piretroitler ve neonikotinoitler olarak sınıflandırılır. Organoklorlu insektisitlerin stabilite ve yağda çözünürlükleri yüksek olduğu için çevrede birikimleri çoktur. Bu sebeple besin zincirine katılarak birçok canlıda birikime sebep olmuştur. Birikim sonucuna bağlı olarak üreme toksisitesi ve ölüm gerçekleşmiştir (Prezosi, 1998). Birçok zararlı etkisi olduğu için organoklorlu insektisitlerin kullanımı yasaklanmıştır. Yaygın olarak karbamatlar ve organofosforlu insektisitler kullanılmaktadır. Organofosforlu insektisitler çabuk parçalanır ve etki ettiği organizmaya yüksek toksisite gösterir. En belirgin özelliği asetilkolin gibi etki göstermeleridir. Asetilkolin esteraz enzimi ile etkileşime girerler ve böylece vücutta

asetilkolin parçalanamaz, sinapslarda birikimi artar sonucunda da sinirsel iletim durur. Bu duruma “asetilkolin zehirlenmesi” denir. Bu birikim sonucunda etki ettiği organizmada çizgili kaslarda kasılmalar, parasempatik sistemin aşırı çalışması, kan basıncında artış gibi durumlar meydana gelmektedir. Karbamatlı insektisit grubu karbamik asit esterleridir. Organofosforlu bileşikler gibi bu grubun da temel toksisite mekanizması asetilkolinesteraz ile etkileşime girmesidir. Gruplar arasındaki farklılıklar yan zincirlerinde var olan yapısal farklılıklardan meydana gelir ve değişik toksikokinetik ve toksikodinamik özelliklerini meydana getirir. Karbamamatlı insektisitlerin etkilediği enzimin reaktif olma süresi kısadır. Buna bağlı olarak da sebep olduğu akut zehirlenmeler sonucu gelişen kolinerjik sendrom kısa sürmektedir (Özkaya vd, 2013). Piretrinler pestisit aktiviteye sahip kurutulmuş kasımpatı çiçeğinin (*Chrysanthemum cinerariifolium*) ekstraktlarından elde edilmişlerdir. Biyoyararlanımı zayıftır ve hızlı metabolize olur buna bağlı olarak da düşük mermeli toksisitesine neden olmaktadır. Güçlü lipofilik ester yapıya sahiptir. Böceklere hızla nüfuz eder ve sinir sistemlerini felç ederler. Piretrinler sodyum kanalları üzerinde etki ederek sinir sisteminin aşırı aktivitesine yol açar (Reigart & Roberts, 2013).

2008 yılında Ulusal Zehir Danışma Merkezi'nin yayınladığı raporda tarım ilaçlarına bağlı zehirlenmeye %47,7 insektisitler sebep olmaktadır. Bunlarında %21 i OP'lar, %18,5'i piretroidler olarak bildirilmiştir (Özcan & İkinciöğulları, 2009). İsektisitlere üretim esnasında , formülasyon hazırlama aşamasında, taşımada ve uygulama esnasında deri ve solunum yoluyla maruz kalınabilir ve mesleki zehirlenmeler de oluşabilmektedir. Pestisitler vücutta yağda depolanmaları ve yavaş olarak vücuda salınmaları nedeniyle kronik zehirlenmelere de sebep olur ve sinir sistemini etkiler, karaciğeri zarara uğratar, sersemlik, baygınlık, baş ağrısı, konvülsiyon, bilinç kaybı, cilt döküntüleri, spermatogenezde bozulma ve üreme sistemi ile ilgili toksik etkilere neden olmaktadır. Gebelik döneminde maruziyet oluşursa bebekte gelişim geriliği veya düşüklere sebep olduğu görülmüştür (Özkaya vd, 2013).

2.1.2. Thiacloprid

Thiacloprid, dünyada en çok kullanılan pestisit çeşit olan neonikotinoitlerin grubundandır. (Z)-N-{3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2-yliden} cyanamide kimyasal adına sahip insektisittir. Gün ışığındaki yarılanma ömrü 19 gün olarak belirlenmiştir ve doğada kalıcılığı orta sürelidir. Plazmada en yüksek konsantrasyona maruziyetten 3-4 saat sonra ulaşmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu Thiacloprid'in; böbrek, karaciğer, akciğer, tiroid, dalak ve deri gibi organlar öncelikli olmak üzere bütün vücuda yayıldığı belirlenmiştir. 1990'lı yılların başından beri kullanılan thiacloprid diğer pestisitlere nazaran memelilere daha az zararlıdır. Böcek sinir sistemine daha fazla afinite gösterip nikotinoik asetil kolin reseptörlerine bağlanarak etkisi gösterir (Yong Zou vd, 2023). Böceğin sinir sisteminin aşırı uyarılmasına sinir sisteminin felce uğramasına, hücre ölümüne sebep olur. Yüksek verimlilikle böceklerden koruma sağladığı için karbamat ve organofosforlu insektisitlerden daha çok tercih edilmiştir ve 2014 yılında küresel böcek ilacı pazar payının çeyreğini oluşturmuştur (Yong Zou vd, 2023). 2020 yılında thiacloprid, aktif madde olarak onayı AB komisyonu tarafından kanserojen riski nedeniyle yenilenmemiştir. ABD Çevre Koruma Ajansı tarafında üreme kategorisi olarak 1b olarak sınıflandırılmıştır. Yasal düzenlemeler genel olarak akut toksisite değerlerine bakılarak hazırlanmıştır ancak çevrede kalıcılık oranlarının ve buna bağlı muhtemel kronik etkilerinin hafife alındığı ortaya konulmuştur.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda thiacloprid maruziyeti sonucu temel hareket aktivitelerinde azalma, göz kapağında dejenerasyon, göz bebeklerinde genişleme, arka ayaklarda kavrama gücü azalması, titreme ve seksüel gelişimde gecikme gibi etkilerin meydana geldiği belirtilmiştir. Ayrıca karaciğer enzimlerinde değişiklikler, vücut ağırlığı azalması, adrenal bez değişimleri, cilt ve gözlerde tahriş, hepatosellüler hipertrofi, tiroid uyarıcı hormon seviyesinde artış, T3 ve T4 hormonları seviyelerinde değişimler, tiroit bezinin ağırlığında değişimler, plazma üre seviyesinin ve tiroksin bağlama kapasitesinin yükselmesi, nefes darlığı, timüsün küçülmesi, retinal atrofi, lens dejenerasyonu, lökosit sayısında artış şeklinde değişiklikler tespit edilmiştir. Ayrıca, Thiacloprid'in karsinojen olduğu ve farelerde yumurtalık tümörüne sebep olduğu tespit edilmiştir. İnsan maruziyeti sonucunda kadınlarda erkeklerden daha yüksek tespit konsantrasyonda kalıntı tespit edilmiştir. İnsan maruziyeti sonucunda

kadınlarda erkeklerden daha yüksek konsantrasyonda kalıntı tespit edilmiş (Agvet, 2001). Zebrabalığı karaciğerinde yapılan çalışmada 1,64 ve 0,82 mg/L olmak üzere iki farklı konsantrasyonda Thiacloprid'e maruz bırakılmış ve tedavi edilmeyen kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. İki thiacloprid çalışma grubunda da kontrol grubuna oranla, daha fazla DNA hasarı görülmüştür. Tek başına thiacloprid tedavi grupları karşılaştırıldığında, 1,64 mg/L doz grubu 0,82 mg/L doz grubundan daha fazla hasar göstermiştir. Bu sonuçta doza bağlı olarak DNA hasarının arttığını göstermiştir (Türel vd. 2023). Pestisit kullanımının iyi tarım uygulaması yöntemiyle yapılan bir ortamda polen ve nektarda Thiacloprid kalıntısına oral yolla maruz kalan arıların 20 dk boyunca felç olduğu, daha sonra iyileştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca daha düşük dozlarda arıların öğrenme performanslarının düştüğü kaydedilmiştir (Kaila vd, 2023). Gelişmekte olan tavuk embriyolarına farklı dozlarda uygulanan Thiacloprid'in embriyo canlılığının azalmasına, beyin ağırlığının azalmasına ve beyin nörokimyasında değişikliğe sebep olmuştur. Daha düşük dozlarda uzuv kusurlarına ve gelişimsel değişikliğe sebep olduğu gözlemlenmiştir (Frag vd, 2022).

23 yaşındaki bir erkek, etanol ile karıştırılmış yaklaşık 100 mL thiacloprid süspansiyonunun kasten yutulmasından 2 saat sonra acil servise başvurmuş; başlangıçta bulantı, kusma ve ajitasyon bildirmiştir ve yuttuktan 2 saat sonra birden fazla jeneralize tonik-klonik nöbet atağı gelişmiştir ve ardından 36 saat sonra hasta hayatını kaybetmiştir (Vinod vd. 2015). Ayrıca deltamethrin ve thiacloprid karışımının insan akciğer fibroblast hücrelerinde hücre çoğalması ve oksidatif stres üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmada deltamethrin ve thiacloprid karışımı ve metabolitlerinin insan akciğer fibroblastlarında GSH (glutasyon) seviyelerini azaltarak ve MDA (malondialdehit) seviyelerini artırarak hücre canlılığını ve oksidatif stresi azaltarak sitotoksisteyi indükleyebileceğini göstermiştir (Sekeroğlu vd, 2020). Pestisitlerin leydig hücreleri üzerinde yaptığı etkiyi araştıran bir çalışmada oksidatif stresin indüklendiği ve buna bağlı olarak testis hücre organellerinde işlev bozukluğu ve erkek infertilitesinin indüklemeye potansiyeli olduğu görülmüştür (Elsharkawy, 2021). Başka bir çalışmada , *Ulva lactuca*'dan ekstrakte edilen PS'nin sıçan üreme sisteminde Thiacloprid tarafından indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu etkilerini belirlemek için yapılmıştır. Çalışma Thiacloprid'in fonksiyonel sperm parametrelerinde ciddi bozukluklara neden olduğunu göstermiştir. Aynı grupta kontrollere kıyasla antioksidan

aktivitelerde ve gen ekspresyonlarında azalma gözlenmiştir. Moleküler veriler de Thiachloprid uygulanan grubun testisinde ciddi bir DNA bozulması olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Thiachloprid ile tedavi edilen grupta ciddi histopatolojik değişiklikler görülmüştür (Kammoun vd. 2017).

2.2. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi dış genital ve iç genital organlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Dış genital organlar penis ve skrotum'dur. İç genital organlar ise testis, epididim, funikulus spermaticus, duktus deferens (Vas deferens), glandula vezikuloza (glandula seminalis) glandula prostatika (prostat), glandula bulbouretralis (cowper bezleri), ejakülat (semen), duktus ejakulatorius'tur. Erkek üreme sisteminin temel fonksiyonları gamet oluşturma, gametler için sıvı oluşturma, erkek cinsiyet hormonlarını üretme, cinsel birleşme, idrar eliminasyonudur (Guyton ve Hall, 2011)

Testis; skrotumda bulunur ve tunika vaginalis olarak bilinen peritoneal boşluğun dış cebi ile anterior ve lateral olarak kısmen çevrilidir. Testisler embriyogenezis süresi boyunca abdominal kavitenin posterior duvarında retroperitoneal olarak yerleşim göstermektedir. Testisler, dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskuloza olarak üç tabaka ile sarılmışlardır. Seminifer tubulleri arasındaki boşluklar küçük damarlar ve lenfatiklerle doludur. Bu intestinal aralık içerisinde erkek cinsiyet hormonu olan testosteron hormonu salgılayan Leydig hücreleri bulunur. 20 µm çapındadır ve testosteron salgıladıkları için küçük damarlarla yakın ilişkide bulunurlar. Seminifer tübüllerde sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler yer almaktadır. Sertoli hücreleri seminifer tubul içinde devamlı bir epitel oluştururlar ve üzerinde FSH ve testosteron reseptörleri bulunmaktadır. Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar vardır bunlar kan-testis bariyerini oluşturur. Görevleri; gelişen spermatozoanın beslenmesini sağlama, spermiogenezin son aşamasında hücrede biriken sitoplazmik artıklarının parçalanması, Andojen-bağlayıcı proteinlerin üretimini sağlama ve inhibin salgılamaktır (Haspolat vd, 2017).

Epididimis; kıvrımlı uzun, ince tübüler bir yapıdır. Epididimisin başındaki hareketsiz dölleme yeteneği olmayan spermatozoaların olgunlaşarak oldukça hareketli ve *in vitro* ortamda yumurtayı dölleme yeteneğine sahip olmasına yardımcı olur (Haspolat vd, 2017)

Vas deferens; epididimisten sonra 40-50 cm uzunluğunda bir kanaldır. Epididimisten spermatozayı ve salgıları alır ve onları prostata iletir.

Seminal vezikül; lümeni çok katlı epitelle döşeli tubuler yapılı bezdir. Ejakulatın büyük hacmini oluşturur ve spermatozoa için besleyici olan bu salgı bol miktarda fruktoz içerir. (Ross ve Pawlina, 2016).

Prostat; seminal sıvının büyük bölümünü oluşturur. Prostat salgıları enzimlerce zengindir. Bu enzimler semen vajinaya bırakıldıktan sonra semenin sıvılaşmasını sağlamaları. Bu sıvılaşma; spermatozoların visköz yapıdakiş ejakulattan kendini serbest bırakmasına izin verir, serviks ve uterustan fallop tüplerine hareket etmesini sağlar. (Haspolat vd, 2017)

Bulboüretal bezler; cinsel uyarılma esnasında kayganlaştırıcı olarak görev yapan mukoz salgıyı salgılar (Guyton ve Hall, 2011).

Pestisitlerin birçok toksik etkisi bulunmaktadır. Üreme sistemi de bu toksisiteden etkinlenmektedir. İnsan erkeği nispeten düşük doğurganlığa sahiptir bu nedenle yaygın laboratuvar hayvanı model türlerden erkeklerin dişiyeye kıyasla üreme toksik maddelerinden daha fazla risk altında olabilir (Working P. K., 1988). Kimyasalların üremeye toksik etkisi erkekte dış genital organların, ventral prostatın ve meme başı dokusunun farklılaşmasına kadınlarda meme kanseri insidansındaki artışa sebep olur. Ayrıca en önemli toksik etki sonucu endokrin bozucu olarak ortaya çıkar (Hoyer, 2001). Bir kimyasalın toksik etkilerini belirlemek için *in vivo* ve *in vitro* testler yapılır. *In vitro* testler daha hızlı, kolay ve ucuz olduğu için bu çalışmada *in vitro* testler çalışılmıştır. Bir ürün genotoksik ise karsinojenik olabilir bu sebeple genotoksikite testleri yapılmaktadır. Oksidatif hasar yapıyorsa hücrenin mitokondrisine zarar verir DNA parçalanabilir ve hücre ölümü gerçekleşebilir. Buna bağlı olarak da infertiliteye sebep olabilir. Bunun için oksidatif hasar tespiti yapılmaktadır. Hücre parçalanmasına bağlı olarak hücre işlevini yitirir ve anamoli oluşur. Bunun tespiti için apoptoz indükleme testi yapılmaktadır. Hücre ölümü ve hücre fonksiyonun bozulduğunu tespit etmek için sitotoksikite testerli de yapılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3. 1: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (15-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik pipet (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir otomatik pipet (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100- 1000 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Wisecry Daihan Scientific
Dijital kamera (TEM Jeol-1011 ile bağlı)	Olympus-Veleta TEM Camera
Elektroforez güç kaynağı	Thermo Scientific (EC300 XL)
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Etüv	Nüve (ES 500)
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CKX4)
Floresan mikroskop	Olympus (BX 53)
Hassas terazi	Mettler (H20)
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikrodalga fırın	Beko
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
Otomatik hücre sayma cihazı	Luna (L10001-Logos)

Bidistile su cihazı Millipore	Gradient
Santrifüj	Rotofix II
Sıvı azot tankı	Cryopal
Su banyosu	Memmert WB14
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Vorteks	Ika NC 28405
Flowsitometri cihazı	beckman coulter cytofle



3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Tablo 3. 2: Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri (EMEM)	Wisent 320026CL
Fetal sığır serumu (FBS)	Wisent 095150
Fosfat tamponu (kalsiyum ve magnezyum içermeyen) (PBS-CMF)	Wisent 311012CL
Fosfat tamponu (PBS)	Wisent 311010CL
Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12 besiyeri (DMEM/F12)	Wisent 319010CL
Penisilin (100 U) / Streptomisin (100 µg/mL) çözeltisi	Wisent 450201EL
Tripsin (1:250)	Biomatic A4027
Sodyum dodesil sülfat	Sigma-Aldrich L5750
Nötral kırmızı Sigma	Aldrich N7005
Thiacloprid	Fluka 37905 ATCC
Mouse testosterone,T ELISA kit	Bioassay Technology Laboratory
Mouse GSH ELISA kiti	Sun Red Bio
Mouse T-SOD ELISAQ kit	Sun Red Bio
Horse serum	wisent 065150

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3. 3: Kullanılan Sarf Malzemeler

Falkon (10 mL, 50 mL) vida kapaklı	Interlab
Hücre kültür kabı 25 ve 75 cm ² 'lik, filtre kapaklı	Nest
Kriyo vial 1,5 mL'lik, vida kapaklı	Axygen
Lamel 24, 48 mm	Menzel
Mikroplaka 6, 24 ve 96 kuyulu	Nest
Örnek saklama kabı 100 örneklik	Interlab
Pastör pipeti 3 mL'lik, plastik, steril	Interlab
Petri kutusu 7-10 cm çapında, plastik	Nest
Pipet ucu 10, 300 ve 1000 µL'lik	Axygen T
Rodajlı düz kesme lam	Menzel (M21201)
Santrifüj tübü 15 mL'lik, vida kapaklı	Interlab
Lateks eldiven	Broche
Nitril eldiven	Broche

3.2. Hücre Kültürü

3.1.4. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken çalışma alanları ve laminar kabinin içi düzenli aralıklarla %70'lik alkol ile temizlendi. Hücre kültürü laboratuvarında çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra ortalama 20 dakika laminar kabinin UV lambaları açıldı ve ortam sterilize edildi. Laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık eldiven kullanıldı ve farklı her çalışmada farklı laboratuvar önlüklerinin kullanılmasına dikkat edildi.

3.1.5. Hücre Dizilerinin Temini ve Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

TM3 (CRL-1714) ve TM4 (CRL-1715) hücreleri Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) kuruluşundan satın alındı. Hücre dizileri -196 °C'de sıvı azot tankı içinde olan kriyo viallerin içerisinde saklandı.

Hücre kültürü laboratuvarında kullanılan tüm çözeltiler laminar kabinin içinde steril ortamda hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanması için kullanılan su otoklavda 120 °C'de 15 dk steril edilerek saf su haline getirildi. Hücreler için kullanılan besiyerleri ve PBS (1X) tampon çözeltisi +4 °C'de muhafaza edildi ve besiyeri en fazla bir hafta içerisinde kullanıldı. Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Eğer FBS inaktive edilmemiş ise; 56°C'de 30 dk. İnkübasyona bırakılıp inaktif hale getirildi. Daha sonra 0,22 µm çapındaki steril filtreden geçirilerek sterilize edildi ve -20 °C'de muhafaza edildi. Çalışmanın yapılacağı gün FBS 37 °C'de çözündürülerek kullanıldı. Çözeltiler aşağıdaki gibi hazırlandı;

- *PBS çözeltisi (1X) hazırlama :*

PBS çözeltisi (10X)'dan 10 mL alınır üzerine 90 mL steril su eklenerek 100 mL tamamlanır.

- *Antibiyotik çözeltisi hazırlama:*

99 ml FBS'li medyum üzerine 1 mL Penisilin/streptomisin (10000U/10000 µg/mL) antibiyotiği eklenir.

- *Trypsin - EDTA çözeltisi hazırlama oranları:*

0,2 g Tripsin ve 0,04 g EDTA tartılır. 100mL PBS (1X) de çözündürülür.

- *Hücre stoklama besiyeri (DMSO'lu)*

1mL DMSO, 1mL FBS çözeltisi, 100µL Antibiyotik çözeltisi (%1) ve 7,9 mL Hücre kültürü besiyeri karıştırılır.

- *TM3 ve TM4 hücreleri için besiyeri:*

1,5 mL FBS çözeltisi, 0,5 mL Antibiyotik çözeltisi, 2,5 mL Horse serum karıştırılır. Üzerine ortalama 45,5 mL DMEM/F-12 besiyeri eklenerek 50mL tamamlanır.

3.1.6. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Edilmesi

Sıvı azot tankında buluna hücreler çıkartılarak 37°C'lik su banyosunda 1-2 dk. bekletildi ve çözündü. kullanılacak tüm malzemeler %70'lik alkolle temizlenerek laminar kabinin içine kondu. Hücreler 15 mL'lik falkon tüpe konuldu üzerine 5 mL serumlu besiyeri eklendi ve pipetajlama yapıldı. Oluşan hücre süspansiyonu 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 3 dk santrifüj edildi ve üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırıldı. DMSO'nun toksik etkisinden kurtulmak için bu işlem iki kere yapıldı. Tüpte kalan hücre pelletine 1 mL serumlu besiyeri eklendi tekrar pipetajlama yapıldı. Hücre süspansiyonu içerisinde 7-10 mL serumlu medyum olan 25 cm²'lik flasklara ekildi. 37 °C'de, %5 karbondioksit (CO₂) ve %90 nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

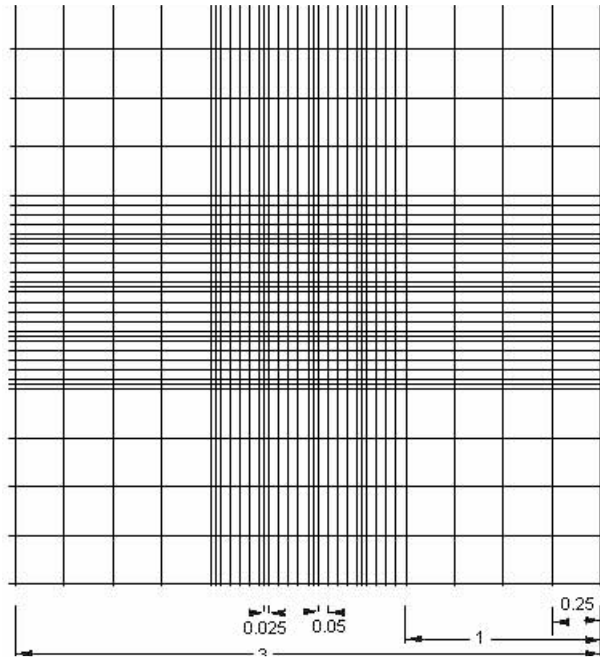
3.1.7. Pasajlama

Hücreler inkübasyondan sonra faz-kontrast invert mikroskopta incelendi. Hücre yoğunluğu %70 sıkışık hale geldiyse kültür devamlılığının sağlanması için pasajlama yapıldı ya da deneylerde kullanıldı. Pasajlama işlemi yapılırken önce süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Tripsin aktivitesini azaltması ve serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak için hücreler PBS (1X) ile yıkandı. Daha sonra yüzeye tutunan hücrelerin ayrılması için kültür ortamına tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. 37 °C'de, %5 CO₂' oranlı inkübatörde 5-10 dk bekletildi. Tutundukları yüzeyden ayrılmış olan hücrelerin üzerine besiyeri eklendi daha sonra 15 mL falkon tüpe alındı. İçinde hücre süspansiyonu olan falkon tüp 1200 rpm hızda 3 dk süre ile santrifüj edildi. Üzerinde kalan süpernatant atıldı ve üzerine 2 mL besiyeri eklenerek süspand edildi. Kaç tane hücremiz olduğunu

belirlemek için hücreler hemositometre lamında sayıldı. Her kuyucukta yaklaşık 10^5 hücre/mL olacak şekilde içinde besiyeri bulunan flasklara koyuldu. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C ısıda %5 CO_2 'li inkübatörde bekletildi. Hücre dizisinin devamlılığının korumak amacıyla pasajlama işlemi haftada 2 kez yapıldı. Hücre kültüründe herhangi bir kontaminasyon vb risklere karşı hücreler belli zaman aralıklarıyla dondurularak saklandı. Bu saklama işlemi; elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre stok hazırlama besiyeri ilave edilmesi ve pastör pipeti pipetajlama yapılması devamında yaklaşık 10^6 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stoklarının soğuğa dayanıklı kriyo viallere aktarılması ve sırasıyla -20°C 'de 30 dk, -80°C 'de 16-24 saat bekletilmesi sonrasında sıvı azot tankına kaldırılması aşamalarıyla gerçekleştirildi.

3.1.8. Hücrelerin Sayılması

Hücre sayımı hemositometre ile yapılır. Hemositometre, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 9 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır. Lamın üzerine 100 mikrolitre hücre süspansiyonundan konur, lamel kapatılır. Daha sonra 100mikrolitre tripan mavisini de eklenerek karıştırılır. Ölü hücrelerin çepherleri dağıldığı için boya hücre içine girer ve mavi renge boyanır. Canlı hücrelerin içine tripan mavisini giremediği için mikroskopta kolaylıkla görünür hale gelir. Sayım şekilde ki karelerde yapılır. Hücreler yüzde oranı ile hesaplanır.



Toplam hücre sayısı/mL = Sayım sonucu x Seyreltme faktörü x 10^4 x Besiyeri miktarı (mL)

3.2. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksik; hücre ölümüne neden olan demektir. Sitotoksisite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin varlığının belirlenmesi için yapılır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmalarının uygulaması kolaydır ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum gösterir. Bu sebeple hayvan deneylerine güzel bir alternatif olmuştur. Sitotoksisite testleri maruziyet sonrası hücrelerin canlılık oranı hakkında bize veri sunar.

3.2.1. MTT

MTT testi sarı tetrazolium tuzunun canlı hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine temeline dayanır. Bu deney canlı hücrelerin mitokondrilerinde oluşan dehidrojenazların tetrazolium tuzunun (MTT) suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşümü yoluyla hücre canlılığını ölçer. Suda çözünmeyen mor renkli formazan ürününü çözündürmek için ortama dimetil sülfoksit (DMSO) eklenir. Hücreler organik çözücü olan DMSO ile çözündürüldükten sonra formazan çözeltisine ait rengin şiddeti 590 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımıyla ölçülür. MTT'nin indirgenmesi sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde oluşur. Bu indirgenmenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla orantılıdır (MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation, 2024).

MTT çözeltisi (5 mg/mL) hazırlanışı:

250 mg MTT, 50mL PBS (1X) de çözündürüldü. Çözelti karanlıkta +4 de muhafaza edildi.

96 Kuyulu mikropalakalara hücreler her kuyuda yaklaşık 100 μ L'de 10^3 - 10^4 hücre olacak şekilde dağıtıldı. Daha sonra 37 $^{\circ}$ C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant atıldı ve kuyular 100 mL PBS (1X) eklendi. Üzerine taze serumlu besiyeri eklendi daha sonra Thioclopid çözeltileri ortama eklendi. MMT testinde TM3 ve TM4 hücreleri için ayrı ayrı; 165, 325, 750, 1000, 1250 1500, 2000, 2500 μ M, maruziyet konstanstrasyonları belirlendi. 24 saat maruziyet yapıldı. Kuyucuklara 20 μ l MTT çözeltisi eklendi ve 2-3

saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra üst faz atıldı oluşan mor renkli fromazan kristalleri çözdürmek için ve 100 µL DMSO eklendi ve 150 rpm'de 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi. Çözeltide oluşan renk 590 nm dalga boyunda absorbanı (690 nm referansa karşı) mikropłaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

Negatif kontrol hücrelerinde gözlenen absorbanı değeri (optik dansite, OD) %100 canlılığa eşdeğer olarak kabul edilir. Enzim aktivitesindeki inhibisyon derecesine göre Thioclopride maruz kalan hücrelerdeki ölüm oranı negatif kontrolün yüzdesi şeklinde hesaplanır.

% inhibisyon konsantrasyonu (IC) = $100 - (\text{ort. OD}_{\text{madde}} \times 100 / \text{ort. OD}_{\text{negatif kontrol}})$

Çalışmada sitotoksik etki potansiyelleri hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu olan IC₅₀ üzerinden değerlendirildi. Ölüm-konsantrasyon ölçü eğrisi oluşturuldu ve IC₅₀ değeri bu eğri üzerinden hesaplandı.

3.2.2. NRU TESTİ

Hücrenin canlılığı nötral kırmızı (Neutral red) boyasını tutabilme kapasitesi ile ölçülmesine dayanır. Canlı hücreler nötral kırmızıyı lizozomlarında tutabilir ölü hücreler ise lizozomlarda tutamaz ve boya dağılır. NRU değerinin düşük olması ile maddenin sitotoksikite potansiyeli orantılıdır (Rodrigues vd, 2023).

Nötral kırmızısı stok çözeltisi (10 mg/mL) hazırlanması:

100 mg Nötral kırmızısı boyası 10 mL besiyeri içinde çözündürüldü. Selüloz asetat filtreden geçirildi ve parçalara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

Nötral kırmızısı çalışma çözeltisi (100 µg/mL) hazırlanması:

100 µL nötral kırmızısı boyası ana stok çözeltisi alınır üzeri 10 mL besiyeri ile tamamlanır.

Çözme solüsyonu (%50 etil alkol, %1 asetik asit)

4,21 mL etil alkol , 80 µL asetik asit ve 3,71 mL steril su karıştırılır.

Hücreler 96 Kuyulu mikrolakalara yaklaşık $10^3 - 10^4$ hücre/100 μL /kuyu olacak şekilde eklendi. 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat süre ile bekletildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant atıldı. Kuyucuklar 100 μL PBS (1X) ile yıkandı. Daha sonra besiyeri eklendi ve Thiacloprid çözeltileri dozları ;165, 325, 750, 1000, 1250 1500, 2000, 2500 μM olacak şekilde ortama eklendi. 24 saatlik maruziyet uygunlandı ve her kuyucuğa 100 μL nötral kırmızısı çalışma çözeltisi eklendi. Canlı hücrelerin boyayı içine alması amacıyla 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2 'li inkübatörde 3 saat bekletildi. İçinde nötral kırmızı olan besiyeri uzaklaştırıldı ve her kuyu 100 μL ılık PBS ile 3 defa yıkanması sonrası 100 μL çözme solüsyonu eklendi. Mikrolakalar orbital çalkalayıcıda tamamen karışması için 150 rpm'de 5 dk süre ile çalkalandı. Çözeltiler 570 nm'de mikrolaka okuyuculu spektrofotometre (Epic) ile ölçüldü. Negatif kontrol olarak Thiaclopride maruz bırakılmamış hücreler benzer şekilde muamele gördü.

Boyanın hücre içine alınma ve depolanma miktarına bağlı olarak gözlemlenen absorbens değeri %100 canlılığa eşdeğer olarak kabul edildi. Değerlendirme IC_{50} üzerinden gerçekleştirildi.

3.3. GENOTOKSİSİTE COMET ile değerlendirilmesi

Genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısı gibi hücrelerin genetik materyalinde ortaya çıkan hasarı tanımlayan terimdir. Genotoksisite için yapılan testler kimyasal maddelerin genetik materyalde oluşturduğu zararı belirlemek için oluşturulmuştur.

DNA hasarını tespit etmede en pratik ve kolay yollardan biri comet yöntemidir. Kısa sürede sonuç alınması, ekonomik olması diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Diğer adıyla tek hücreli jel elektroforezi olan comet yöntemi; hücrelerin izolasyonu sonrası lizis çözeltisinde bekletilmesi ve DNA'nın açığa çıkarılması temeline dayanır. Daha sonra hücre DNA'ları elektroforez cihazı ile yürütülür daha sonra boyanır. Negatif yüklü DNA parçalarının elektrik alanda anoda doğru göç ederek

kuyruklu yıldız benzer görüntü oluşturur ve görüntüler floresans mikroskopu ile Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK programı ile değerlendirilir.

Stok Lizis çözeltisi hazırlanışı;

146,1 g (2,5 M) NaCl , 37,2 g 100 mM EDTA ve 1,2 g 10 mM Tris karıştırılır. Üzeri 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

Stok 100µg/ml Etidyum Bromür (EB) çözeltisi

5 mg EBr üzeri 50 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

Nötralizasyon tamponu

48,5 g 0,4 M Tris üzeri 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

TM3 VE TM4 hücreleri 12 kuyuklu hücre plakalarına ortalama 10^5 hücre/ μ l civarında olacak şekilde ekildi. Thiocloprid iki hücre içinde 50, 250 ve 500 μ M konsantrasyonlarında uygulandı. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonra her kuyuktaki besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS (1X) ile yıkandı. Daha sonra üzerine %0,2 tripsin 0,5 mL eklendi ardından hücreler toplandı. 1200 rpm hızda, 4°C’de 3 dk santrifüj edildi, üst kısım uzaklaştırılıp hücreler 100 μ l PBS ile yıkandı sonra tekrar santrifüj edildi. Ortalama 50 μ l hacminde hücre süspansiyonu düşük erime noktası olan 100 μ l agar ile karıştırıldı ve üzeri normal erime noktalı agarla kaplı olan lamlara lamel ile yayıldı. Agorozun donması için 10 dk buzdolabında bekletildi. sonra lamel lamın üzerinden alındı. Lamalar lizis çözeltisine dizildi ve karanlıkta 4°C 1 saat bekletildi. saat sonunda lamalar soğuk distile suyunda 5 dk bekletilerek yıkandı. Daha sonra lamalar içinde alkali tampon çözeltisi olan elektroforez tankına yerleştirildi 20 dk bekletildi. Ardından 25 volt, 300 miliamper 20 dk elektroforez işlemi uygulanarak DNA’ların anoda doğru yürümesi sağlandı. İşlem sonunda lamalar soğuk distile su ile yıkandı. Nötralizasyon tamponunda 4 °C de 10 dk bekletildi. Lamalar kuruduktan sonra üzerine EtBr’den 100µl damlatılıp lamel kapatıldı. Negatif kontrol olarak Thioclopride maruz bırakılmamış hücreler aynı prosedürle hazırlandı. Pozitif kontrol olarak ortalama 100 μ M hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanıldı. ETBr çözeltisi ile boyanan örnekler floresan mikroskopta 40x10 büyütme ile Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK yazılımı vasıtasıyla analiz edildi. Her lamın farklı bölgelerinden toplam 100-200 hücre sayıldı. Değerlendirme için kuyuktaki DNA yoğunluk yüzdesi kullanıldı.

3.4. Apoptoz İndükleme

Kit içeriği şu şekildedir; 0,5 mL Annexin V-FITC, 1 mL Propidium İyodür ve 30 mL Annexin V bağlayıcı tamponu. 6 kuyulu mikrolakalara yaklaşık $2,5 \times 10^5$ hücre/2 mL/kuyucuk yoğunluğunda hücre ekildi. 37°C 'de %5 CO_2 'li ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra süpernatant atıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Üzerine besiyeri eklendi ve daha sonra 50, 250, 500, 750 μM Thiocloprid çözeltileri kuyulara eklendi. 24 saat maruziyete bırakıldı. Pozitif kontrol için 100 μM H_2O_2 3saat boyunca maruziyete bırakıldı. Daha sonra süpernatant ayrı bir tüpe alındı, kuyular 2 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı ve üzerine % 0,2'lik tripsinden 1 mL eklendi. Oluşan hücre süspansiyonu grubun tüpüne eklendi ve 1200 rpm'de 3 dk mikrosantrifüj edildi. Daha sonrası 2 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkandıktan sonra tekrar her yıkamada 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Hücreler 1mL 1X bağlayıcı tampon ile yıkandı. Tekrar 1200rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Ardından 100 μL hücre süspansiyonu üstüne 5 μL Annexin V-FITC ve 10 μL PI eklendi 15 dk karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Flowsitometri cihazı kullanarak ölçümleri alındı. Negatif kontrol olarak Thiocloprid'e maruziyeti yapılmamış hücreler aynı şekilde analize hazırlandı. Sonuçlar toplam hücre miktarının yüzdesi olarak değerlendirildi. Sonuca göre canlı hücreler Annexin V-FITC (-)/ Propidium İyodür (-), erken apoptik hücreler Annexin V-FITC (+)/ Propidium İyodür (-), geç apoptik hücreler Annexin V-FITC (+)/ Propidium İyodür (+), nekrotik hücreler ise Annexin V-FITC (-)/ Propidium İyodür (+) şeklinde değer gösterir.

3.5. Oksidatif Hasar Oluşturma

Hücrede enerji üretimi için oksijen kullanılır. Mitokondri oksijen kullanırken reaktif oksijen türlerini açığa çıkarır. Bu türler serbest radikal olarak da adlandırılır. Her enerji üretimi sırasında, endojen ve eksojen ajanlarla da serbest radikaller meydana gelebilir. Oluşan bu serbest radikaller hücrelerde protein, lipid, DNA ve karbonhidratla ile reaksiyona girebilir ve oksidatif DNA hasarı, mutajenite, karsinojenite gibi zararlara yol açar.

3.5.1. ROS Testi

6 kuyulu mikropalakalara yaklaşık $2,5 \times 10^5$ hücre/2 mL/kuyucuk yoğunluğunda hücre ekildi. 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra süpernatant atıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Üzerine besiyeri eklendi ve daha sonra 50, 250, 500, 750 µM Thiocloprid çözeltileri kuyulara eklendi. 24 saat maruziyete bırakıldı. Pozitif kontrol için 100 µM H₂O₂ 3saat maruziyete bırakıldı. Daha sonra süpernatant ayrı bir tüpe alındı, kuyular 2 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı ve üzerine %0,2'lik tripsinden 1 mL eklendi. Oluşan hücre süspansiyonu grubun tüpüne eklendi ve 1200 rpm'de 3 dk mikrosantrifüj edildi. Daha sonrası 2 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkandıktan sonra tekrar her yıkamada 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Ardından hücreler peleti 100 µl PBS içinde süspanse edildi ve 10 µL DCFH₂-DA 20 uM solüsyonu ile boyandı, 30dk 37 °C karanlık ortamda bekletildi. Boyama sonunda santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra BSA (%1) ile yıkandı ve flowsitrometre ile analiz edildi. Sonuçlara göre RFU (relative fluorescence units) değeri ROS oluşum potansiyelini gösterdi.

3.5.2. MDA Testi

MDA hücre oksitadif strese uğradığında hücre çeperindeki lipit yapının bozunmasıyla ortaya çıkan son ürün kimyasallardır. ELISA kit aracılığıyla deney yapıldı. Bu deneyde her konsantrasyon için 3 tekrar çalışıldı. Hücre süspansiyonu 3000 rpm hızda 20 dk santrifüj edildi. Standart çözeltiler kit protokolüne seyreltilerek toplam 5 adet hazırlandı. Daha öncesinden hazırlanmış olan tane örneğimiz var. Kitin içerisindeki kuyucuklara örneklerimizden 40 µl eklendi ve örnekler üzerine kitin içersinden çıkan MDA- antibody çözeltisinden 10 µl eklendi. 5 kuyucuğa da hazırladığımız standart çözeltilerden 50 µl eklendi. 1 kuyucuk blank olarak kullanıldı. Ardından hazırlanan tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin HRP eklendi ve 60 dk 37 °C de inkübatörde bekletildi. Süre sonunda kuyucukları boşaltıldı ve 150 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara sırasıyla 50 µl A maddesi 50 µl B maddesi eklendi. 10 dk 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 50 µl stop çözelti eklenerek 10 dk içersinde 450nm'de Plat reader (Epoch, Biotek, Almanya).cihazda absorbans değerleri okutuldu. Standartölçü eğrisine göre absorbanslara karşı değerlendirildi.

3.5.3. GSH Tayini

Glutasyon (GSH) üç amino asitten oluşan bir tripeptittir: glutamin, sistein ve glisin. Hücrelerde bulunan ve onları oksidatif stresten ve serbest radikallerin, peroksitlerin ve ağır metallerin neden olduğu hasardan korumaya yardımcı olan önemli bir antioksidandır. Deney ELISA kit aracılığıyla yapıldı Bu deneyde her konsantrasyon için 3 tekrar çalışıldı. Hücre süspansiyonu 3000 rpm hızda 20 dk santrifüj edildi. Standart çözeltiler kit protokolüne seyreltilerek toplam 5 adet hazırlandı. Daha önceden hazırlanmış olan tane örneği bulunmaktadır. Kitin içerisindeki kuyucuklara örneklerimizden 40 µl eklendi ve örnekler üzerine kitin içersinden çıkan MDA-antibody çözeltisinden 10 µl eklendi. 5 kuyucuğa da hazırladığımız standart çözeltilerden 50 µl eklendi. 1 kuyucuk blank olarak kullanıldı. Ardından hazırlanan tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin HRP eklendi ve 60 dk 37 °C de inkübatörde bekletildi. Süre sonunda kuyucukları boşaltıldı ve 150 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara sırasıyla 50 µl A maddesi 50 µl B maddesi eklendi. 10 dk 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 50 µl stop çözelti eklenerek 10 dk içersinde 450 nm'de Plat reader (Epoch, Biotek, Almanya) cihazda absorbans değerleri okutuldu. Standartölçü eğrisine göre absorbanslara karşı değerlendirildi.

3.5.4. T-SOD Değerlendirmesi

Total superoksitdismütaz (SOD) tayini ELISA kit aracılığıyla yapıldı. Bu deneyde her konsantrasyon için 3 tekrar çalışıldı. Hücre süspansiyonu 3000 rpm hızda 20 dk santrifüj edildi. Standart çözeltiler kit protokolüne seyreltilerek toplam 5 adet hazırlandı. Daha öncesinden hazırlanmış olan tane örneğimiz var. Kitin içerisindeki kuyucuklara örneklerimizden 40 µl eklendi ve örnekler üzerine kitin içersinden çıkan MDA- antibody çözeltisinden 10 µl eklendi. 5 kuyucuğa da hazırladığımız standart çözeltilerden 50 µl eklendi. 1 kuyucuk blank olarak kullanıldı. Ardından hazırlanan tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin HRP eklendi ve 60 dk 37 C de inkübatörde bekletildi. Süre sonunda kuyucukları boşaltıldı ve 150 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara sırasıyla 50 µl A maddesi 50 µl B maddesi eklendi. 10 dk 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 50 µl stop çözelti eklenerek 10 dk içersinde 450nm'de Plat reader (Epoch biotek, almanya).cihazda

absorbans değerleri okutuldu. Standartölçü eğrisine göre absorbanslara karşı değerlendirildi.

3.6. TESTOSTERON Ölçümü

Testosteron leydig hücreleri tarafından üretilir. Bu nedenle testosteron seviyesi ölçümü sadece TM3 hücre grubunda tayini yapılmaktadır. ELISA Kit içeriğindeki kullanılacak çözeltiler hazırlandı. Her örnek 3 kere çalışıldı. Örneklerimizden 50 µl kuyucuklara konuldu üzerine 50 µl antijen eklendi. 60 dk 37 °C %5 CO₂ ortamda inkübe edildi. Inkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltıldı. 150 µl yıkama çözeltisiyle 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara 50 µl HRP çözeltisi eklendi ve tekrar 60 dk 37 °C %5 CO₂ ortamda inkübe edildi. Inkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltıldı. 150 µl yıkama çözeltisiyle 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklara sırasıyla 50 µl A maddesi 50 µl B maddesi eklendi. 10 dk 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 50 µl stop çözelti dökülerek 450nm'de Epoch marka cihazda absorbans değerleri okutuldu. Standart eğresi hazırlandı ve absorbansarı kullanarak testosteron konsantrasyonları hesaplandı.

3.7. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Bradford testi protokolüne göre yapıldı. Bu test, Coomassie Brilliant Blue boyasının proteinlere bağlanma yeteneğine dayanır. Boya, bağlanmamış haldeyken ağırlıklı olarak katyonik bir formda (kırmızımsı kahverengi renk) bulunur. Boya proteinlere bağlandığında, mavi olan anyonik bir forma geçer. Bilinmeyen numunelerdeki protein konsantrasyonunu belirlemek için, sığır serum albümini (BSA) gibi standart bir proteinin bilinen konsantrasyonları kullanılarak bir standart eğri oluşturulur.

96 kuyucuklu mikrolakalarda bulunan 200 µL BSA standardı üzerine 10 µL hazırlanan boya çözeltisi eklendi. BSA'lı standart çözeltiler 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 ve 1,0 µg/µL olacak şekilde hazırlandı. 37 C'de 5-10 dk inkübe edildi daha sonra mikrolaka okuyuculu spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm yapıldı.

Bilinmeyen numunelerin absorbans değerleri daha sonra protein konsantrasyonlarını hesaplamak için standart eğri ile karşılaştırıldı. Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre. 10^4 hücrede bulunan protein miktarı μg olarak hesaplandı.

3.8. İstatiksel Anlamlılık Testi

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 23.0 for Windows paket programı kullanılarak tek yönlü varyans (ANOVA) analizi (Post Hoc-Tukey ve Dunnet testi) uygulandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Standart eğriler doğrusal regresyon analizi yapılarak saptandı.

4. BULGULAR

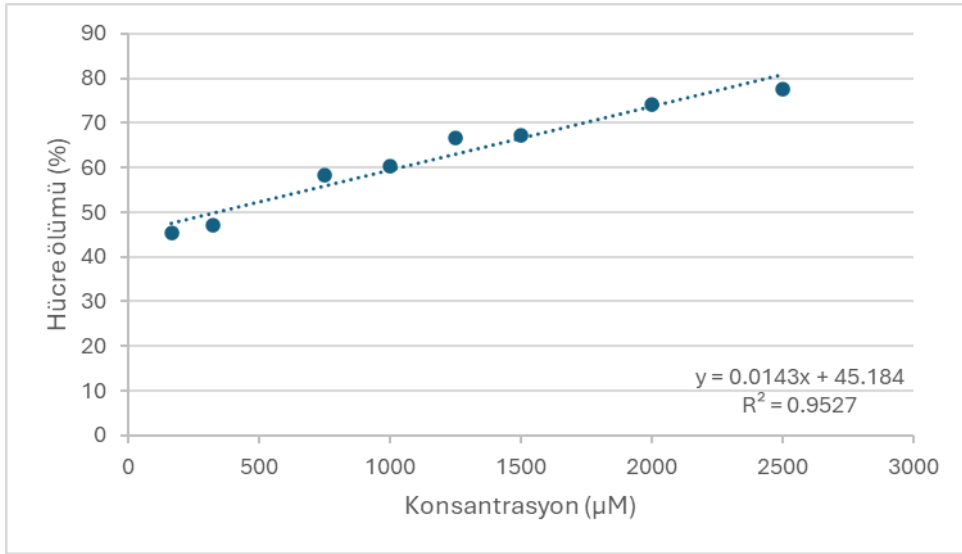
Çalışmada insektisid grubunda yer alan Thiacloprid maddesinin erkek üreme hücresi olan TM3 ve TM4 hücrelerinde sitotoksik etkisi (MTT, NRU testleri ile), genotoksik etkisi (comet testi ile), oksidatif hasar ve apoptoz oluşturma potansiyeli *in vitro* olarak araştırıldı.

4.1. TM3 VE TM4 Hücre dizilerinde sitotoksisite değerlendirilmesi

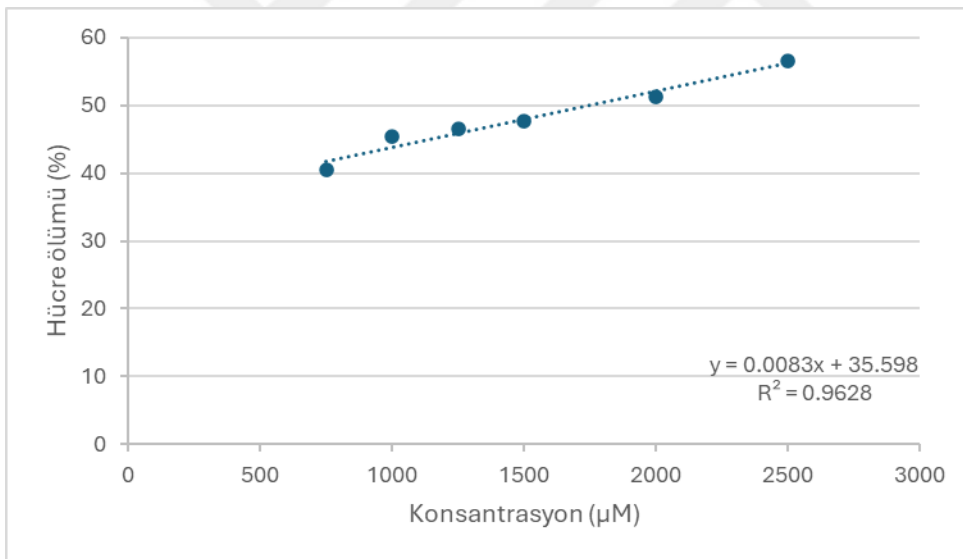
Thiacloprid'in TM3 ve TM4 hücre dizileri üzerine sitotoksik etki potansiyelleri;165, 325, 750, 1000, 1250 1500, 2000, 2500 μM konsantrasyon miktarında Thiacloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile değerlendirildi. MTT ve NRU sitotoksisite testleri ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.

4.1.1. MTT testi ile değerlendirilmesi

MTT deney protokolü doğrultusunda ölüm oranları belirlendi. TM3 hücresi IC_{50} 336,7 μM olarak, TM4 hücresi IC_{50} değeri 1761,1 μM olarak belirlenmiştir. Her iki hücre içinde ölüm oranı doza bağımlı olarak artmıştır.



Şekil 4. 1: TM3 Hücre hattında MTT testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi

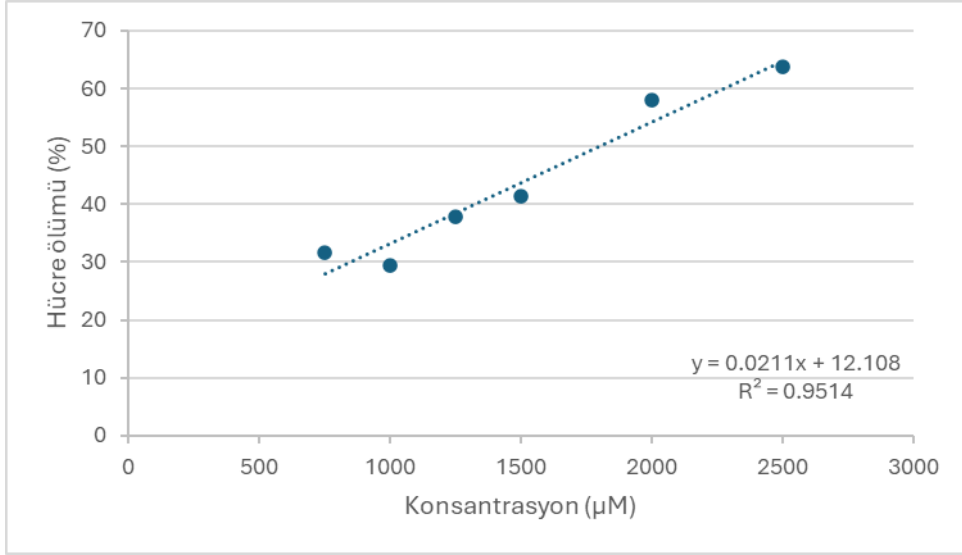


Şekil 4. 2: TM4 Hücre hattında MTT testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi

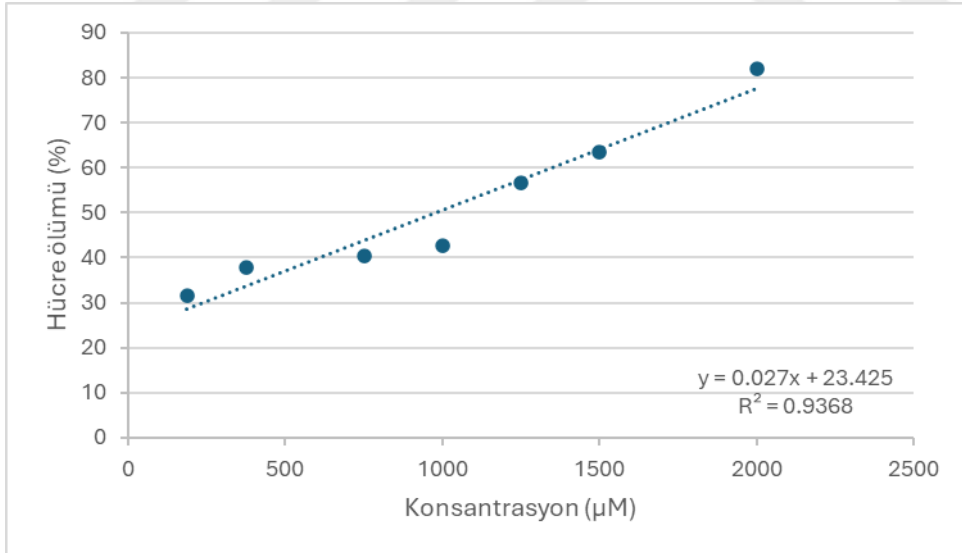
4.1.2. NRU testi ile değerlendirilmesi

Nötral red uptake testi protokolü doğrultusunda ölüm oranları değerlendirildi. NRU sonuçlarına göre TM3 hücresi IC_{50} 1795,82 µM olarak belirlenmiştir. NRU sonuçlarına

göre TM4 hücresi IC₅₀ 984,25 µM olarak belirlenmiştir. Her iki hücre için de ölüm oranı artan dozlarda artış göstermiştir.



Şekil 4. 3: TM3 Hücre hattında NRU testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi



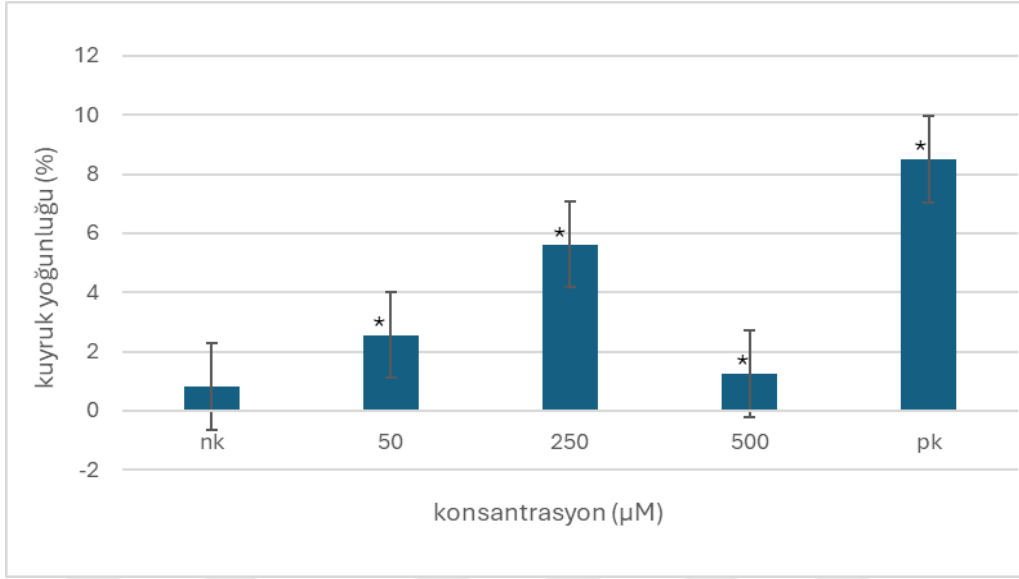
Şekil 4. 4: TM4 Hücre hattında NRU testi ile sitotoksisite değerlendirilmesi

Tablo 4. 1: TM3 ve TM4 Hücrelerinde NRU ve MTT testler ile sitotoksosite değerlendirilmesi

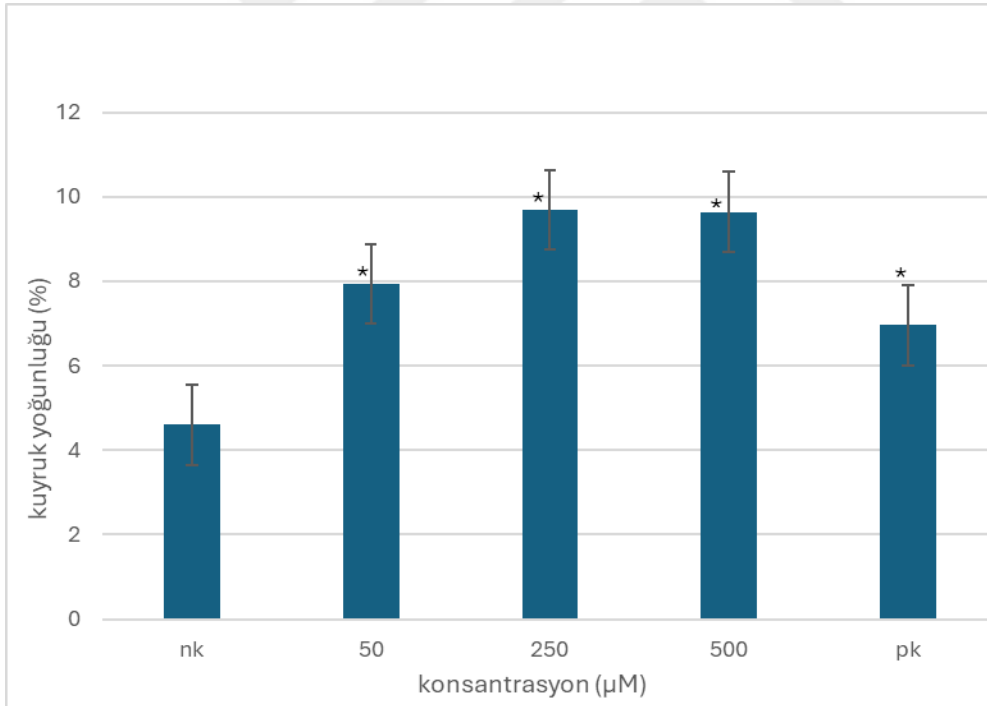
Konsantrasyon (μM)	NRU Ölüm oranı (%)		MTT Ölüm oranı (%)	
	TM3	TM4	TM3	TM4
165	26,98	31,59	45,08	16,39
325	33,28	37,79	47,02	20,69
750	31,67	40,28	58,24	40,41
1000	29,49	42,83	60,38	45,44
1250	37,93	56,66	66,81	46,54
1500	41,45	63,52	67,39	47,78
2000	58,00	82,14	74,22	51,31
2500	63,77	76,01	77,53	56,60
IC₅₀ (μM)	1795,82	984,25	336,70	1761,10

4.2. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Genotoksisite değerlendirilmesi

TM3 ve TM4 hücre dizisi üzerine genotoksik etkisi 50, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarda maruziyeti takiben comet testi aracılığıyla değerlendirildi. Sonuçlar aşağıdaki gibidir. TM4 hücresinde doza bağımlı olarak artan DNA hasara meydana gelmiş ancak TM3 hücresinde DNA hasarı dozdan bağımsız olarak meydana gelmemiştir.



Şekil 4. 5: TM3 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli * $p \leq 0,05$



Şekil 4. 6: TM4 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli * $p \leq 0,05$

Tablo 4. 2: TM3 ve TM4 hücrelerinde DNA hasar oluşturma potansiyeli.

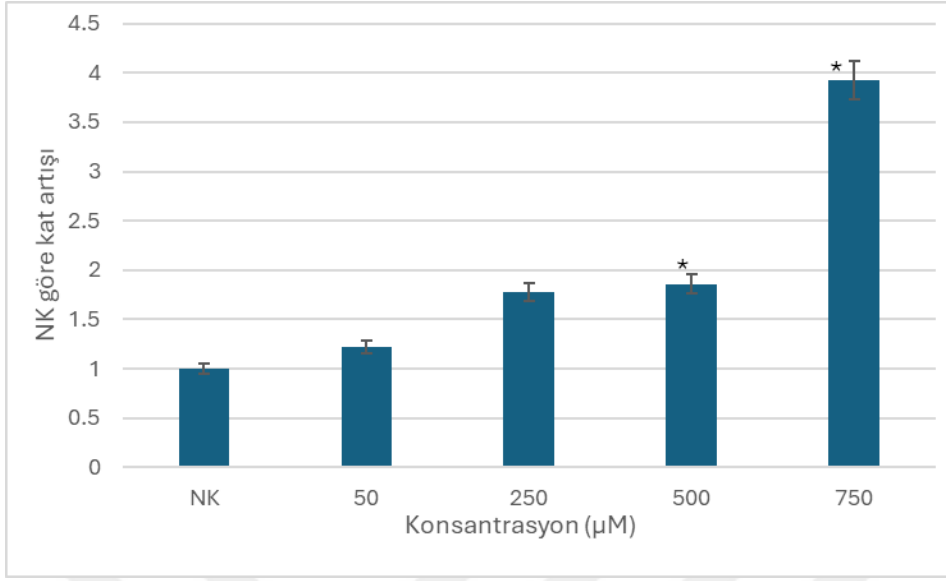
	Konsantrasyon (μM)	Kuyruk yoğunluğu
TM4	NK	4,60812
	50	7,942071*
	250	9,697282*
	500	9,642876*
	PK	6,968022*
TM3	NK	0,82802
	50	2,64141*
	250	5,628184*
	500	1,25316*
	PK	8,515057*

* $p \leq 0,05$ **4.3. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Apoptoz indüklenme değerlendirilmesi**

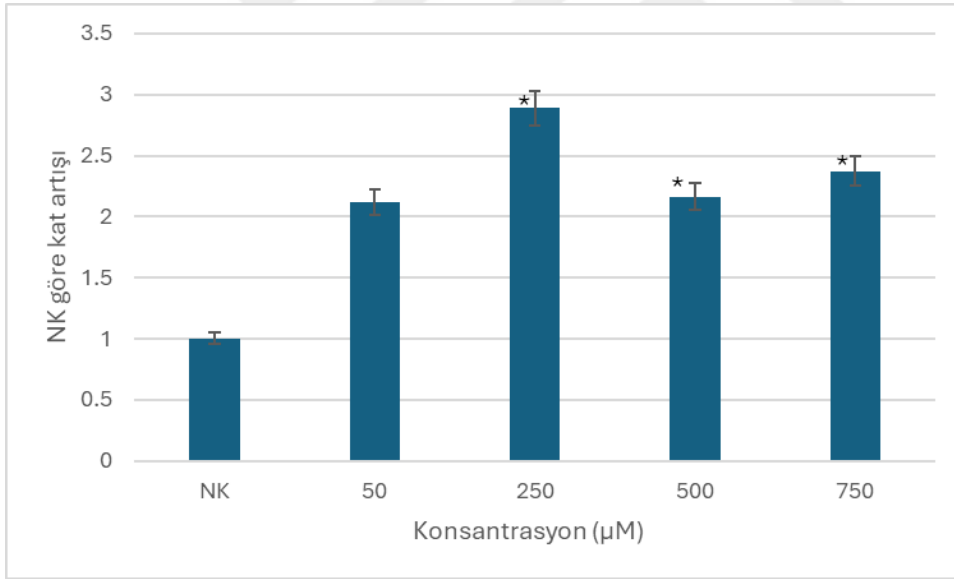
Thiaclopid'in TM3 ve TM4 hücre dizisi üzerine apoptoz hasar oluşturmaları farklı konsantrasyonlarında değerlendirildi. TM4 hücresinde apoptoz oluşumu ortalama 2 kat artmış, TM3 hücresinde ise doza bağımlı olarak apoptoz oluşumu artmıştır.

Tablo 4. 3: TM3 ve TM4 apoptoz indüklenme potansiyeli

Konsantrasyon (μM)	Apoptoz (Kontrole göre kat artış)	
	TM4	TM3
NK	1	1
50	2,121	1,222
250	2,889	1,776
500	2,165	1,859
750	2,374	3,923



Şekil 4. 7: TM3 hücresinin apoptoz indüklenme potansiyeli



Şekil 4. 8: TM4 hücresinin apoptoz indüklenme potansiyeli

4.4. TM3 ve TM4 Hücre dizilerinde Oksidatif Hasar oluşturma potansiyeli değerlendirilmesi

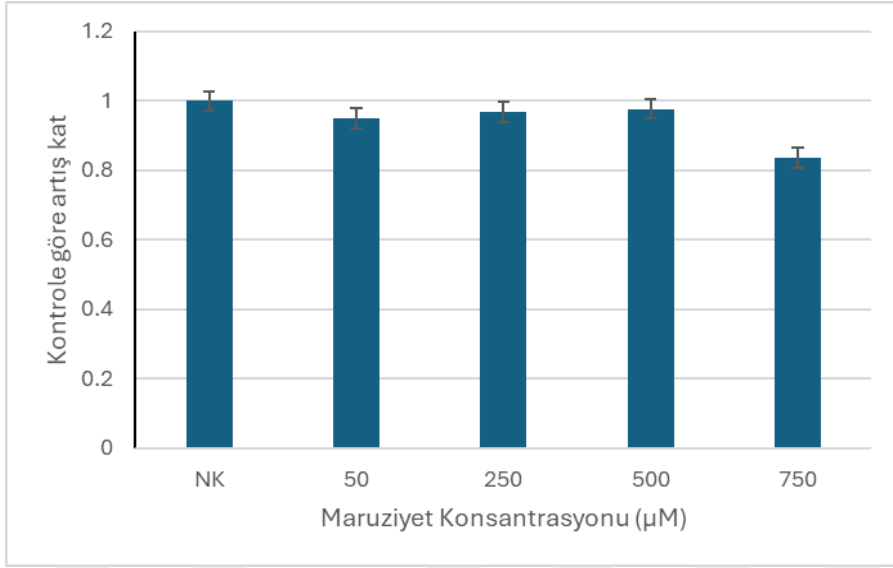
Thiacloprid'in TM3 ve TM4 hücre dizisi üzerine oksidatif hasar oluşturmaya 50, 250, 500, 750 μM konsantrasyonlarda maruziyeti ELISA aracılığıyla tayin edilmesi suretiyle gerçekleştirildi. Sonuçlar aşağıdaki gibidir. TM3 hücresinde doza bağlı olarak oksidatif hasar artış göstermiştir. TM4 hücresinde dozdan bağımsız oksidatif hasar gözlenmiştir.

4.4.1. ROS indüklenme potansiyeli değerlendirilmesi

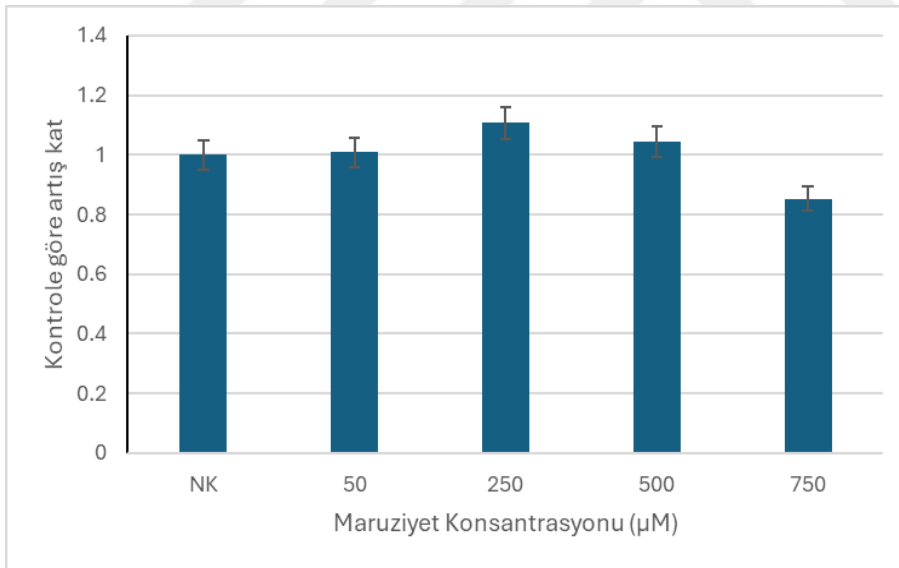
24 saat boyunca farklı konsantrasyonlara (50 – 750 μM) maruz bırakılan TM3 ve TM4 hücrelerinde ROS seviyeleri ölçülüp kontrole göre kat artışı hesaplandı. Sonuçlara göre her iki hücre hattında herhangi anlamlı artışa ve azalışa neden olmamıştır. Sonuçlar Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4. 4: Thiacloprid'in TM3 ve TM4 hücre dizilerinde ROS indüklenme potansiyeli

Konsantrasyon (μM)	Kontrole göre kat artış	
	TM3	TM4
NK	1	1
50	0,94	1,01
250	0,96	1,11
500	0,97	1,05
750	0,83	0,85



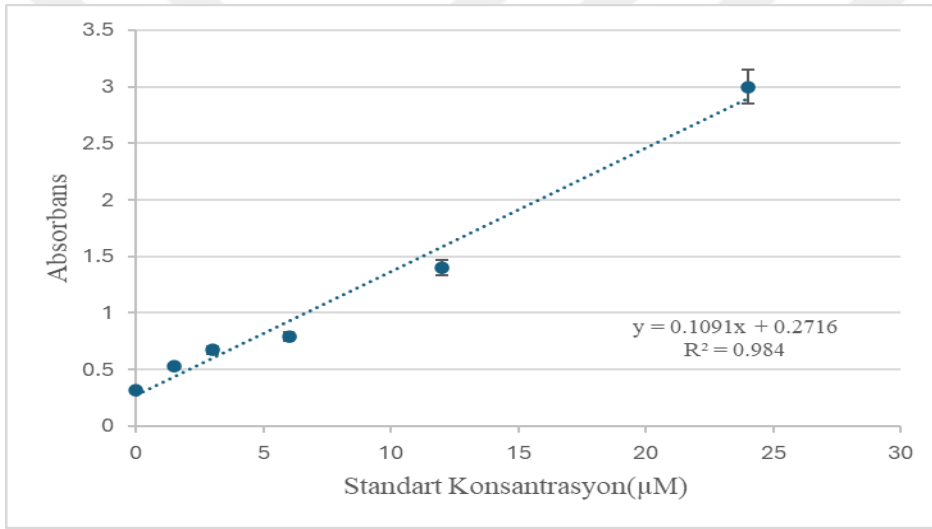
Şekil 4. 9: Thiachlopid'in TM3 hücresinde ROS oluşturma potansiyeli



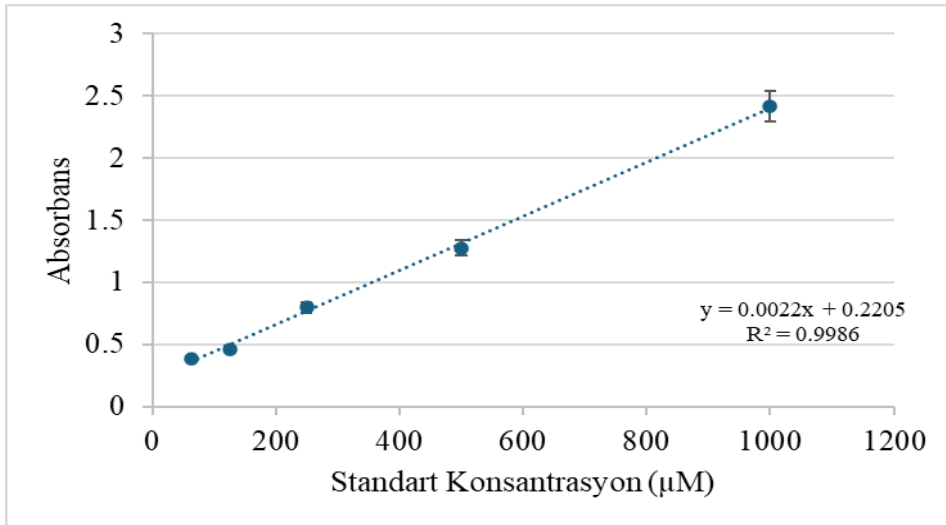
Şekil 4. 10: Thiachlopid'in TM4 hücresinde ROS oluşturma potansiyeli

4.4.2. MDA, GSH ve T-SOD seviyeleri değerlendirmesi

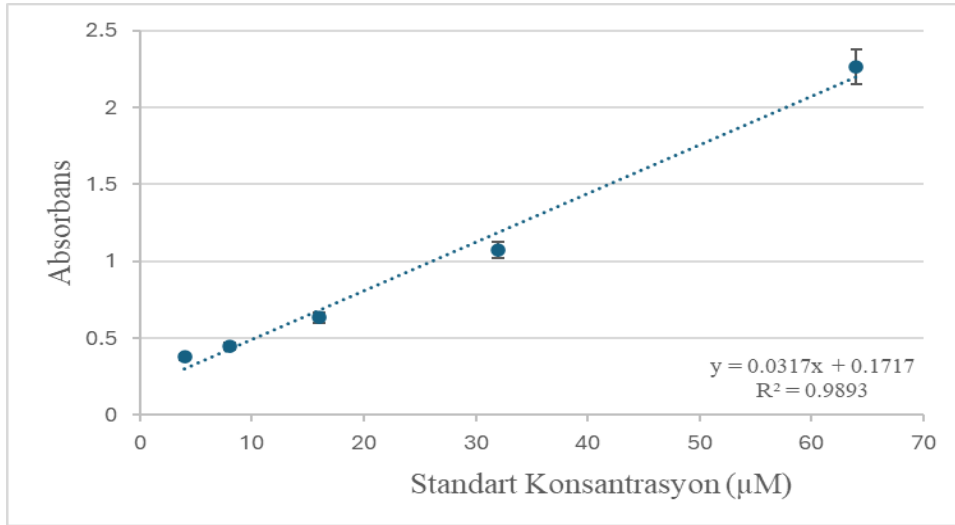
Yapılan değerlendirme sonucu MDA dzeyi TM3 hccesinde $\geq 1,2$ kat artış, TM4 hccesinde anlamlı bir sonuç gzlenmemiştir. GSH dzeyinde TM3 hccesinde ≤ 2 kat artış daha sonra doza bağımlı olarak bu kat artışında azalma meydana gelmiştir ve TM4 hccesinde doza bağlı olarak ≥ 50 kat azalma meydana gelmiştir bu azalma doza bağlı olarak devam etmiştir. SOD dzeyinde TM3 hccesinde $50 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda artmış $250 \mu\text{M}$ da $7,4$ kat azalmış ve $50 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda $1,06$ kat azalmıştır ve TM4 hccesinde $\geq 0,6$ kat artış gzlenmiştir.



Şekil 4. 11: MDA standart eğrisi



Şekil 4. 12: GSH standart eğrisi



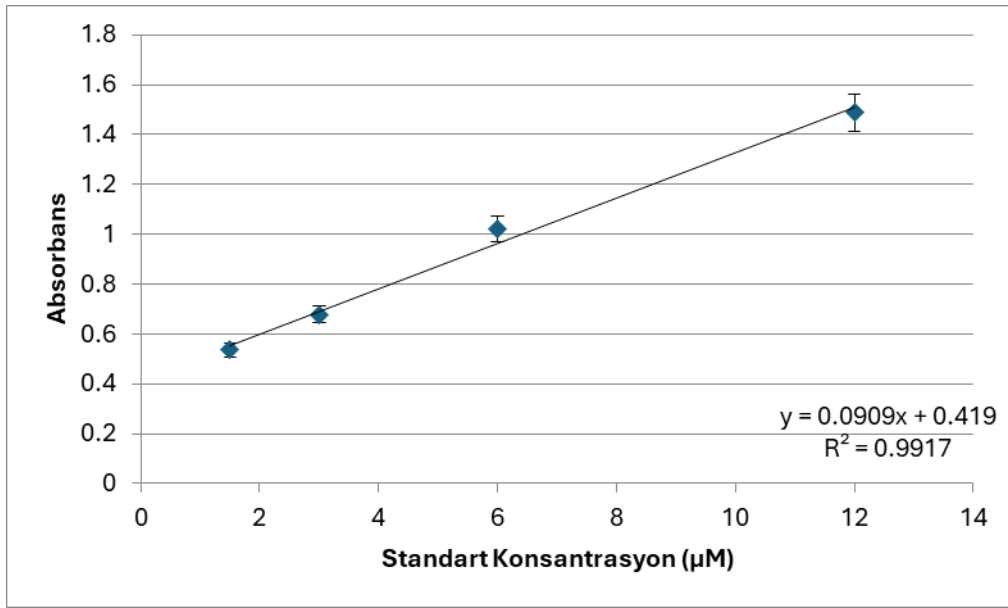
Şekil 4. 13: T-SOD standart eğrisi

Tablo 4. 5: Thiacloprid'in farklı konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılan TM4 ve TM3 hücrelerindeki oksidatif stres indüklemesi

Konsantrasyon (µM)	MDA (µg /g protein)		GSH (µg /g protein)		SOD (µg /g protein)	
	TM3	TM4	TM3	TM4	TM3	TM4
50	2697,07	383,33	35652,77	493,86	2298,30	1411,68
250	4246,82	5291,98	21496,49	415,08	182,53	1947,50
500	3943,64	2647,01	18544,71	372,50	1266,17	1310,61
NK	2222,48	3108,03	17280,53	26403,15	1354,70	2319,78

4.5. TM3 Hücresinde Testosteron Ölçümü

Kit ile tedarik edilen standartı kullanarak standart eğrisi hazırlanmıştır (şekil 4.14). Kitin protoklü örneklere uygulandığında ve hazırlanan standart ölçü eğrisi kullanarak örneklerdeki testosteron seviyeleri µM olarak hesaplanmıştır. Örneklerde hücrelerin sayısı farklı olabilmesi hesaplara katarak sonuçlarımızı µg/ g protein olarak hesaplanıp tekrarların ortalamaları gösterildi (Tablo 4.9). Thiacloprid'in Testosteron seviyesinde azalmalara neden olmuştur, kontrole göre bu azalma konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığını ve 22,1 – 33,3 % arasında olduğunu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 14: Testosteron tayini standart eğrisi

Tablo 4. 6: Thiacloprid'e maruz kalan TM3 hücresinde testosteron miktarı

Konsantrasyon (µM)	Testosteron (µg/ g protein)
50	880,86*
250	767,95*
500	755,18*
NK	1130,83

5. TARTIŞMA

Pestisitler ürün verimliliğinde ne kadar iyi sonuçlar veriyor olsa da doğru doz ve metod kullanılmamasına bağlı olarak ortaya çıkan olumsuz etkiler kaygı oluşturmuştur. Thiacloprid Neonicotinoid grubuna ait bir pestisit türüdür. Kullanımına bağlı ortaya çıkan olumsuz etkiler Thiacloprid hakkında daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç olduğu görünmüştür.

İnsektisid grubuna dahil olan Klorpirifos (CPF)'un zebra balığı hücrelerine yaptığı sitotoksik etkiyi araştıran çalışmada, yaptıkları *in vivo* testlere dayanarak, LC₅₀ 18,03 µg/L olarak hesaplanmıştır. Balıkların LC₅₀ değerinin 1/10'una (1,8 µg/L) ve 1/5'ine (3,6 µg/L) CPF maruz bırakılarak incelenmiştir. CPF'nin subletal konsantrasyonlarına maruz bırakılan balıklarda ve solungaç hücrelerinde (DrG) morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. MTT ve NR deneylerinin sonuçları, 96 saatte CPF'ye maruz kalan hücrelerin hayatta kalmasında önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir. Ayrıca ROS üretiminde (DrG hücreleri) ve enflamatuar, proapoptotik ve apoptotik genlerin ekspresyonunda önemli değişiklikler bulunmuştur. (Abdul Wazith vd, 2024).

Lambda-cyhalothrin (LCT) ve Karate® mikroformülasyonu (%25 a.i.) insektisid grubunda yer alan tarım ilaçlarıdır. Bu ilaçların çin hamster yumurtalık (CHO-K1) hücreleri üzerindeki genotoksisitesi ve sitotoksisitesi açısından analiz edilen çalışmada, genotoksisiteyi test etmek için sitokinez-blok mikronükleus sitomu (CBMN-cyt) ve alkali tek hücre jel elektroforezi (SCGE) deneyleri yapılmıştır. Sitotoksisiteyi tahmin etmek için nötr kırmızı alımı (NRU), süksinik dehidrogenaz aktivitesi (MTT) ve apoptojenik indüksiyon kullanılmıştır. Her iki bileşik de 0,1-100 µg/mL konsantrasyon aralığında analiz edilmiştir. Kültürler 10 ve 100 µg /mL'lik en yüksek konsantrasyonlara maruz bırakıldığında sadece Lambda-cyhalothrin (LCT) mikronükleus (MN) sıklığında önemli bir artışa neden olmuştur. LCT ile 10 ve 100 µg/mL'de maruziyet yapılan kültürlerde NDI'de (Nükleus Bölünme İndeksi) belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Karate® hem canlı hücre oranının hem de süksinik dehidrogenaz aktivitesinin inhibisyonuna neden olmuş ve maruziyetten 24 saat sonra apoptozu tetiklemiştir. Alkali tek hücre jel

elektroforezi (SCGE) , Karate®'in LCT'ye göre genotoksik etkileri indüklemeye daha yatkın olduğunu göstermiştir (Laborde vd, 2023).

Bu tez çalışmasında 165, 325, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500 μ M maruziyet konstanstrasyonlarında 24 saat maruziyet yapıldı. TM3 hücresi için IC_{50} 336,7 μ M, TM4 hücresi IC_{50} değerini 1761,1 μ M olarak bulundu.

Thiacloprid'in erkek Wistar sıçanlarının üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerini araştıran bir çalışmada otuz sağlıklı erkek sıçan ve kontrol grubu 56 gün boyunca ağızdan düşük (22,5 mg/kg) ve yüksek dozda (62,1 mg/kg) thiacloprid uygulanmıştır. Thiacloprid, vücut ağırlığını ve bağıl testis ağırlığını, ayrıca sperm kalitesini (sayı, hareketlilik, canlılık ve morfoloji) doza bağlı olarak önemli ölçüde ($p<0,05$) azaltmıştır. Bu çalışmada yapılan comet testi sonucuna göre testis dokusunda DNA parçalanması olmuş ve üreme fonksiyonunda bozulma meydana gelmiştir. (Mahmoud, 2023).

Thiacloprid'in zebra balığı karaciğerinde potansiyel DNA hasarını comet yoluyla tespit eden bir çalışmada 21 gün boyunca 1,6 ve 0,82 olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda maruziyet yapılmış ve doz uygulanmamış grupla karşılaştırılmıştır. 21 günün sonunda Thiacloprid uygulanan gruplarda DNA hasarı gözlemlenmiştir. Artan Thiacloprid dozajının karaciğer dokusunda daha fazla DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir (Türel vd, 2023).

Thiacloprid'in tam kan sığır kültürleri üzerindeki olası genotoksik etkisi, kromozomal anormallikler, mikronükleuslar, kardeş kromatid değişimleri, DNA hasarı ve apoptotik DNA parçalanma analizleri kullanılarak araştırılmıştır. Tam kan hücreleri ekimin son 24 ve 48 saatinde thiacloprid'e (30, 60, 120, 240 ve 480 μ g/mL) maruz bırakılmıştır. Kardeş kromatid değişimlerine yansıyan replikasyon hasarı göz önüne alındığında, her iki donörde de 24 saat boyunca önemli artışlar gözlenmiş (120–480 μ g/mL; $p<0,01$ veya $p<0,05$). Comet testinde 2 saatlik maruziyet sonrasında istatistiksel olarak anlamlı DNA hasarı gözlenmiştir (240 ve 480 μ g/mL; $p<0,05$, $p<0,01$). DNA elektroforetik ayrımı, Thiacloprid'in geç apoptotik etkisini doğrulamamıştır. Mitotik indeks, sitokalsin ile bloke edilmiş proliferasyon ve proliferasyon indeksleri gibi ek değişkenlerdeki azalma, Thiacloprid'in sırasıyla hücre proliferasyonunu etkileyerek

ve/veya inhibe ederek sitotoksik/sitostatik etkileri indüklemeye ve sırasıyla hücre döngüsünü etkileme yeteneğini göstermiştir (Galdíková vd, 2019).

İnsan periferik kan lenfositlerinin, *in vitro* olarak insektisitlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldığı çalışmada genotoksik ve sitotoksik etkiler, alkalik kuyruklu yıldız ve tripan mavisi boya dışlama analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. DNA hasarı iki genotoksisite parametresi kullanılarak değerlendirilmiştir : kuyruk uzunluğu ve kuyruklu yıldız frekansı. $2,8 \cdot 10^{-4}$ ila $1,7 \cdot 10^{-3}$ M imidacloprid (Gaucho 70 WS) ; $0,6 \cdot 10^{-1}$ ila $1,4 \cdot 10^{-1}$ M Thiacloprid (Calypso 480SC), ; 2 saat süreyle $1,2 \cdot 10^{-1}$ ila $9,5 \cdot 10^{-1}$ M klotianidinin'e (Poncho) maruz bırakılmıştır, konsantrasyona bağlı bir ilişkiyle DNA hasarında önemli bir artışa neden olmuştur. $2,0 \cdot 10^{-3}$ M imidacloprid (Gaucho 70 WS) , $2,0 \cdot 10^{-1}$ M Thiacloprid (Calypso 480SC), 1,07 M klotianidinin (Poncho) 'e maruz kalan hücrelerde sitotoksisite gözlenmiştir. Ayrıca $3,3 \cdot 10^{-3}$ M imidacloprid (Gaucho 70 WS) , $2,8 \cdot 10^{-1}$ M Thiacloprid (Calypso 480SC) ve 1,42 M klotianidinin (Poncho) dozunda hücre ölümü meydana gelmiştir (Calderón-Segura vd, 2012).

Bu tez çalışmasında 50, 250 ve 500 μ M dozlarda 24 saatlik Thiacloprid maruziyeti yaparak comet testi uygulandı. Test sonucuna göre DNA hasarı tespit edildi. Ancak artan dozlarda TM4 hücresinde hasar artmış, TM3 hücresinde dozdan bağımsız olarak DNA hasarı artmıştır.

Yüksek sıcaklığın ekotoksisite modeli *Daphnia magna*'da asetamiprid (ACE) ve Thiacloprid'in (Thia) toksisitesini değiştirme potansiyeli araştıran bir çalışmada; CYP450 monooksijenazların (ECOD), ABC taşıyıcı aktivitesinin (MXR) ve olay hücrel reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretiminin modülasyonu, standart 21 °C ve yükseltilmiş 26 °C sıcaklıklarda ACE ve Thia'nın subletal konsantrasyonlarına (0,1-, 1,0 μ M) akut (48 saat) maruz kalmanın ardından prematüre daphnidlerde taranmıştır. Akut maruziyetlerin gecikmeli sonuçları, 14 günlük iyileşme süresi boyunca izlenen daphnidlerin üreme performansına dayalı olarak değerlendirilmiştir. ACE ve Thia'ya 21 °C maruz kalma, ECOD aktivitesinde orta düzeyde indüksiyon, MXR aktivitesinde belirgin inhibisyon ve daphnidlerde ciddi ROS aşırı üretimi ortaya çıkarmıştır. Yüksek termal rejimde, uygulamalar ECOD aktivitesinin önemli ölçüde daha düşük indüksiyonu ve MXR aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır, bu da

neonikotinoidlerin bastırılmış bir metabolizmasına ve daphnidlerde daha az bozulmuş membran taşıma aktivitesine işaret etmektedir. Yüksek sıcaklık tek başına, kontrol daphnidlerinde ROS seviyelerinde üç kat artışa neden olurken, Neonicotinoid maruziyeti üzerine ROS aşırı üretimi daha az vurgulanmıştır. ACE ve Thia'ya akut maruziyet, daphnidlerin üremesinde de önemli düşüslere neden olmuş ve çevresel olarak ilgili konsantrasyonlarda bile gecikmeli sonuçlara işaret etmiştir. Hem maruz kalan daphnidlerdeki hücresel değişiklikler hem de maruziyet sonrası üreme çıktılarındaki azalmalar meydana gelmiştir (Ács vd, 2023).

Zebra balıklarında (*Danio rerio*) su kaynaklı Thiacloprid (0,4, 4 ve 40 μM) ile 21 gün boyunca *in vivo* veya 412,9 μM ile 24 saat boyunca *in vitro* çalışma üzerine fenotipik tepkilere ve toksisite mekanizmalarına araştırılmıştır. *In vivo* olarak, Thiacloprid'nin şiddetli oksidatif strese, hepatik anormalliklere, alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz sızıntısına ve apoptoza neden olduğu bulunmuştur. RNA-sekanslama analizi, Thiacloprid maruziyeti altında p53 sinyal yolunun aktivasyonunu göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışma, Thiacloprid zehirlenmesinin reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlı p53 sinyal yolunu aktive ettiğini ve zebra balığı karaciğer hücrelerinde hepatotoksisiteye neden olduğunu göstermiştir. P53 inhibitörü pifithrin- α (10 μM) ilavesi, oksidatif stresi azaltarak ve p53 sinyal yolunu ve apoptozu inhibe ederek Thiacloprid kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruma sağlamıştır (Xie vd, 2022).

Biz bu tezi yazarken TM3 ve TM4 hücre dizisi üzerine oksidatif hasar oluşturmasını değerlendirmek için 50, 250, 500, 750 μM konsantrasyonlarda maruziyeti uyguladık. Test sonucunua göre oksidatif hasar meydana gelmiştir.

Thiacloprid tarımsal verimlilikte ne kadar faydalı olsada karsinojenik olması ihtimali, üreme sistemine ve endokrin sistemine kronik toksik etki oluşturması nedeniyle TM3 ve TM4 hücresi üzerine sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırıldı. Comet, Ros, NRU, apoptoz indüklenme testleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre Thiacloprid TM3 hücresine TM4 hücresine oranla daha sitotoksik etki göstermiştir.

6. SONUÇ

Günümüzde thiacloprid'in tarımda zararlılarla mücadelede fazla kullanıldığı bilinmekte ancak yeteri kadar üzerinde çalışma yapılmadığı görülmektedir. Thiacloprid ile ilgili yapılan çalışmaların çevre ve insan sağlığı açısından toksik etkilerden korunmak için büyük önem taşımaktadır.

Tez çalışmasında elde edilen bulgularda Thiacloprid'in sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak thiacloprid kullanılırken gerekli tedbirlerin alınması gerektiğine ve daha çok araştırması yapılması gerektiğine dikkat çekeceğine inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdul Wazith M.J. Taju G. Abdul Majeed S. Mithra S, Nafeez Ahmed A, Badhusha A, Rajkumar V, Sahul Hameed AS S, M. (2024, nisan). A comparative study on targeted gene expression in zebrafish and its gill cell line exposed to chlorpyrifos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*.
- Abdullah Akdoğan, Ü. D. (2012). Pestisitlerin Önemi ve Ekosisteme Etkileri. *Akademik Gıda*, s. 125-132.
- Ács A, Komáromy A, Kovács AW, Fodor I, Somogyvári D, Györi J, Farkas A András Ács, A. K. (2023, haziran). Temperature related toxicity features of acute acetamiprid and thiacloprid exposure in *Daphnia magna* and implications on reproductive performance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*.
- Aysun Altıkat, T. T. (2009). Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri . *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg*, s. 87-92.
- Babayigit M., Tekbaş Ö.F, Cetin H. (2014). Zararlılarla Mücadelede Kullanılan Pestisitlerin Halk. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, s. 405-412.
- Calderón-Segura M.E., Gómez-Arroyo S., Villalobos-Pietrini R., Martínez-Valenzuela C., Carbajal-López Y., Calderón-Ezquerro Mdel C., Cortés-Eslava J., García-Martínez R., Flores-Ramírez D., Rodríguez-Romero M.I., Méndez-Pérez P., Bañuelos-Ruíz E., et., al. (2012). Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Toxicology*.
- Güler, Ç., Çoban Z. (1997). Pestisitler. *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi no:52*. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü.
- Elsharkawy, E. E. (2021). Oxidative Stress of Pesticide Residues Leads to Male Infertility. *Biomed Journal of Scientific & Technical Research*.

- EPA. (2024). *Basic Information about Pesticide Ingredients*. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients> adresinden alındı.
- Erdoğan, B. Y. (2010). Samsun'da Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin-The Health and Environmental Effects Of The Pesticides Commonly Used In Samsun. *Alinteri Journal of Agriculture Science*. .
- FAO. (2022). Pesticides use, pesticides trade, and pesticides indicators global, regional and country trends, 1990–2020. *Faostat Analytical Brief 46*.
- Farag, M.R., Alagawany, M., Moselhy, A.A.A., Said, E.N., Ismail, T.A., Di Cerbo, A., Pugliese, N., Ahmed, M.M., Mayada, R., Farag, M. A. (2022). The Neonicotinoid Thiacloprid Interferes with the Development, Brain Antioxidants, and Neurochemistry of Chicken Embryos and Alters the Hatchling Behavior Modulatory Potential of Phytochemicals. *Biology*.
- Galdíková, M., Holečková, B., Šivíková, K., Schwarzbacherová, V., Koleničová, S., Martina Galdíková, B. H. (2019). Evaluating the genotoxic damage in bovine whole blood cells in vitro after exposure to thiacloprid. *Toxicology in Vitro*.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2011). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, 80: 973-977
- Yusuf Kenan Haspolat YK, Büyükgebiz A, Yolbas I, Aktar F. , A. B. (2017). Organa Genitalia. *Puberte*. Orient. s: 11-14.
- Hoyer, P. B. (2001). Reproductive toxicology: current and future directions. *saBiochemical Pharmacology*.
- Kaila, L., Antinoja, A., Toivonen, M., Jalli, M., Loukola, O.J., Lotta Kaila, A.A. (2023). Oral exposure to thiacloprid-based pesticide (Calypso SC480) causes physical poisoning symptoms and impairs the cognitive abilities of bumble bees. *Kaila et al. BMC Ecology and Evolution*.
- Kammoun, I., Bkhairia, I., Abdallah, F. B., Jaballia, I., & Ktari, N. (2017). Potential protective effects of polysaccharide extracted from *Ulva lactuca* against male reprotoxicity induced by thiacloprid. *Archives Of Physiology And Biochemistry*.

- Kılınç, A. (2016). Neonikotinoit Grubu İsektisitlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.
- Reigart, R.J., Roberts, J.R. (2013). [Chapter 4 pyrethrins pyrethroids](#). *Recognition and management of pesticide poisonings*. 6th Edition.
- Laborde, M.R.R., Larramendy, M.L., Soloneski, S. Milagros, R.R. Laborde, M. L. (2023, EKİM). Cytotoxic and genotoxic profiles of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its microformulation Karate® in CHO-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- Mahmoud, A. A. (2023). Thiacloprid impairs reproductive functions of male Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.
- Sigma-Aldrich, *MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*. Erişim Tarihi (15.07.2024), Erişim site adı: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.
- Agvet- National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals (2001). Evaluation of the new active thiacloprid in the new product Calypso 480 SC Insecticide. *National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals*. Canberra-Australa.
- Özcan N., İkinçioğulları D. D. İ. (2009). Ulusal Zehir Danışma Merkezi 2008 YILI. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*.
- Osman Tiryaki, R. C. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri . *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, s. 154-169.
- Özkaya G., Çeliker A., Giray B.K., Gülru Özkaya, A.Ç. (2013). İsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye'deki durumun değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, s. 75-102.
- Özpolat Çakar, N., Kutsal, D., Kiran, S. (2020). Tarım Çalışanlarında Pestisit Maruz Kalımı ve Kronik Böbrek Hastalığı. *Ankara Med Journal*, s. 761-772.

- PAN- Germany report, P. (2012). Pesticides and health hazards Facts and figures. *Pestizid Aktions*.
- Prezosi, P. (1998). Natural and antropogenic environmental oestrogens: The scientific basis for risk assessment. Endocrine distruptors as environmental signalers. *Pure and Applied Chemistry*, s. 1617-1631.
- Rodrigues R. M., Stinckens M., Ateş G., Vanhaecke T. (2023). *Neutral Red Uptake Assay to Assess Cytotoxicity In Vitro*. Erişim Tarihi (15.07.2024). Erişim site adı: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-3052-5_15
- Ross, M. H., Pawlina, W. (2010). *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ross, M. H., ve Pawlina, W. (2016). Male Reproductive System. M. H. Ross, W. Pawlina, M. H. Ross, & W. Pawlina (Dü) içinde, *Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology* (7. b., s. 790-833). China: Wolters Kluwer Health.
- Sekeroğlu, V., Karabıyık, A., & Sekeroğlu, Z. A. (2020). Co-exposure to deltamethrin and thiacloprid induces cytotoxicity and oxidative stress in human lung cells. *Toxicology and Industrial Health*, s. 916-924.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, G. v. (2023). *13.3 Tarım İlacı (Pestisit) Kullanımı*. Türkiye Cumhuriyeti Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı: <https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834> adresinden alındı
- Türel, G. Y., Toğay, V. A., & Çelik, D. A. (2023). Genotoxicity of thiacloprid in zebrafish liver. *Archives of Environmental & Occupational Health*, s. 152-157.
- Vinod, K. V., Srikant, S., & Thiruvikramaprakash, G. (2015). A fatal case of thiacloprid poisoning. *American Journal of Emergency Medicine*.
- Working, P. K. (1988). Male Reproductive Toxicology: Comparison of the Human to Animal Models. *Environmental Health Perspectives*. 77: 37-44.

Xie, Z., Lu G., Zhou, R., Ma, Y (2022). Thiacloprid-induced hepatotoxicity in zebrafish: Activation of the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways regulated by p53 signaling pathway. *Aquatic Toxicology*.

Zou, Y., Zhang, L., Yue, M., Zou, Z., Wu, X., Zhang, Q., Huang, Y., Zeng, S., Chen, C., Gao, J., Yong Zou, L.Z. (2023). Reproductive effects of pubertal exposure to neonicotinoid thiacloprid in immature male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*.



HAM VERİLER



FORMLAR



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

NEONİKOTİNOİD GRUBU PESTİSİTLERİN ÜREME TOKSİSİTESİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRMESİ: THİAKLOPRİD ÖRNEĞİ

Yazar şeyma apari

Gönderim Tarihi: 26-Tem-2024 10:17AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2422653845

Dosya adı:

SI_NI_N_I_N_VI_TRO_DEG_ERLENDI_RMESI_THI_AKLOPRI_D_O_RNEG_I.pdf
(799.16K)

Kelime sayısı: 11169

Karakter sayısı: 76342

NEONİKOTİNOİD GRUBU PESTİSİTLERİN ÜREME TOKSİSİTESİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRMESİ: THİAKLOPRİD ÖRNEĞİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 10	% 4	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 7
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	Submitted to Koc University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to Harran Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	webdosya.csb.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	tatdtoksikoloji.org İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to Cumhuriyet University Öğrenci Ödevi	<% 1

fullsepp.com

