

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

NEONİKOTİNOİT GRUBU İNSEKTİSİTLERİN
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ADEM KILINÇ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL ÖZDEN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI




İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı YÜKSEK LİSANS Programında Adem KILINÇ tarafından hazırlanan Neonikotinoid Grubu İsektisidlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

27 / 01 / 2016

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr. GÜL ÖZHAN İ. Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
2.Doç.Dr. SİBEL ÖZDEN İ.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
3.Yard.Doç.Dr. Ayfer BECEREN M.Ü. Eczacılık Fak. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	
4.	
5.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Adem KILINÇ



İTHAF

Değerli eşim Semra Kılınç ve biricik kızlarım Zeyneb Şura Kılınç ve Elif Naz Kılınç'a
ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve desteklerini esirgemeyen Danışman hocam Doç. Dr. Sibel ÖZDEN'e,

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca her konuda yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gül Özhan'a,

Deneysel çalışmalarımda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Mine Şenyıldız'a ve

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve Çalışanlarına
Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50347.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pestisitler.....	4
2.1.1. İnektisitler.....	5
2.1.2. Neonikotinoit Grubu İnektisitler	7
2.1.2.1. Asetamiprid	10
2.1.2.2. Klotianidin.....	11
2.1.2.3. İmidakloprid	12
2.1.2.4. Thiakloprid	13
2.1.2.5. Tiyametoksam	15
2.2. Hücre Kültürü	16
2.2.1. Hücre Kültür Koşulları.....	19
2.3. Sitotoksisite Testleri.....	21
2.3.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi).....	22
2.3.2. MTT Testi	23
2.3.3. XTT Testi	23
2.3.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	25
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	25

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler	26
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	27
3.4.1. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	27
3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini	28
3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	28
3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması	29
3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)	29
3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	29
3.4.7. Hücrelerin Sayılması	30
3.4.8. 96 Kuyucuklu Mikropalakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	30
3.4.9. Test Maddelerinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması	31
3.4.10. Hücre Kültürünün Test Maddelerine Maruz Bırakılması	33
3.5. Sitotoksosite Testleri	35
3.5.1. MTT Testi	35
3.5.1.1. MTT Testinin Esası	35
3.5.1.2. MTT Testi Protokolü	35
3.5.2. Nötral kırmızı alım (NRU) testi	36
3.5.2.1. NRU Testinin Esası	36
3.5.2.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı	36
3.5.2.3. NRU Testi Protokolü	36
3.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	37
3.5.4. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	39
4.1. Test Maddelerinin SH-SY5Y Hücrelerinde Sitotoksitesisi	39
4.1.1. Thiaklopid	39
4.1.2. Asetamiprid	41
4.1.3. Klotianidin	42
4.1.4. İmidaklopid	44
4.1.5. Tiyametoksam	46
4.2. Test Maddelerinin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitesisi	48
4.2.1. Thiaklopid	48
4.2.2. Asetamiprid	50
4.2.3. Klotianidin	51

4.2.4. İmidaklopid.....	53
4.2.5. Tiyametoksam.....	55
5. TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	70



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Pestisitlerin mücadele edilen zararlıya göre sınıflandırılması (Wood, 2010).	4
Tablo 2-2: Asetamipridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EC, 2004).....	10
Tablo 2-3: Klotianidinin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EPA, 2003a)...	12
Tablo 2-4: İmidaklopridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (FAO, 2013; NPIC, 2013).....	13
Tablo 2-5: Tiyametoksamın fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EC, 2006)..	16
Tablo 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	40
Tablo 4-2: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	42
Tablo 4-3: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	44
Tablo 4-4: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	45
Tablo 4-5: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	47
Tablo 4-6: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	49
Tablo 4-7: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	51
Tablo 4-8: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.....	53

Tablo 4-9: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.	54
Tablo 4-10: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC ₅₀ değerleri.	56



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nikotin ve neonikotinoit grubu bazı pestisitlerin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2-12: Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler (Freshney, 1994).....	19
Şekil 2-13: Epitelyal benzeri hücreler (Freshney, 1994).....	19
Şekil 2-14: Lenfoblast benzeri hücreler (Freshney, 1994).....	20
Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikropalakaya hücre ekimi.....	31
Şekil 3-2: Test maddelerinin 1/2 oranında seyreltilmesi.....	33
Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikropalaka düzeni.....	34
Şekil 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	39
Şekil 4-2: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	40
Şekil 4-3: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	41
Şekil 4-4: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	42
Şekil 4-5: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	43
Şekil 4-6: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	43
Şekil 4-7: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	44
Şekil 4-8: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	45
Şekil 4-9: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	46
Şekil 4-10: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	47
Şekil 4-11: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	48
Şekil 4-12: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.....	49

Şekil 4-13: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	50
Şekil 4-14: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	51
Şekil 4-15: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	52
Şekil 4-16: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	52
Şekil 4-17: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	53
Şekil 4-18: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	54
Şekil 4-19: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	55
Şekil 4-20: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADI	Günlük alınmasına izin verilen miktar
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APVMA	Zirai ve Veteriner Kimyasalların Kaydı için Ulusal Otorite
ATCC	Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu
CO ₂	Karbondioksit
CYP450	Sitokrom P450 enzim sistemi
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
dk	Dakika
DMEM/F12	Dubelco'nun modifiye edilmiş eagle besiyeri/F12 besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Avrupa Birliği Komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asid
EMEM	Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri
EPA	Çevre Koruma Ajansı
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu
FBS	Fetal Sığır Serumumu
g	Gram
GC	Hücre büyüme kontrolleri
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat iyonu
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
HepG2	İnsan hepatoselüler karsinoma hücresi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IC ₅₀	%50 İnhibisyon konsantrasyonu
LD ₅₀	Medyan letal doz
LDH	Laktat Dehidrojenaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptörü
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid

nm	Nanometre
NPIC	Ulusal Pestisit Bilgi Servisi
NRU	Nötral kırmızı alım testi
NOEL	Hiçbir toksik etki gözlenmeyen doz
O ₂	Oksijen
ODSC	Düzeltilmiş çözücü kontrol optik dansitesi
ODÖrnek	Düzeltilmiş örnek optik dansitesi
PC	Pozitif kontrol grubu
PBS-CMF	Fosfat tamponu (kalsiyum ve magnezyum içermeyen)
PBS	Fosfat tamponu
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
SC	Çözücü kontrol grubu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücreleri
TEPP	Tetraetilpirofosfat
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
XTT	(2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid)
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

ÖZET

Kılınç, A. (2015). Neonikotinoid Grubu İnsektisidlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tarımsal üretimde, hasat sonrası depolamada önemli miktarlarda ürün kaybına neden olan, ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyen bitki hastalıkları, zararlılar ve yabancı otlarla mücadelede en etkili yöntem olmaları, ekonomik şekilde üretilmeleri ve kullanımlarının kolay olması tarım ilaçlarının (pestisit) sıklıkla tercih edilmelerinin sebebidir. Ancak üreticilerin daha fazla ve kaliteli ürün elde edebilmek için gereğinden fazla pestisit tüketmeleri, bilinçsiz ve hatalı uygulamalar, gıda maddelerinde yüksek düzeyde pestisit kalıntılarına sebep olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, pestisitlerin sinir sistemini etkileyici, endokrin sistemi bozucu kronik toksik etkileri yanı sıra mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkilerinin de söz konusu olabileceği rapor edilmiştir. Neonikotinoitler yeni grup insektisitler olup, çeşitli haşerelerin kontrolünde kullanılmaktadır. Neonikotinoitler sistemik özellikte olup, genellikle böceklerin santral sinir sistemini etkiler, paralize ve ölüme sebep olur. Neonikotinoitler tohumların korunmasında kullanıldığında çevrede kalıcı olabilir ve bitkilerin nektar ve polenlerinde kalıntı olarak yerleşebilir. Bu özellikleri arılar ve diğer polen taşıyıcılar için bir risk oluşturabilir ve böylelikle çevre sağlığına zararlı etkileri bulunabilir. Yüksek Lisans Tez çalışmasında sıklıkla kullanılan neonikotinoit grubu insektisitlerden asetamiprid, klotianidin, imidakloprid, thiakloprid, tiyametoksam'ın insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) ve nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre dizileri üzerine 24 ve 48 saat maruziyetleri sonucu MTT ve NRU testi kullanılarak sitotoksik etki potansiyelleri değerlendirildi. SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat maruziyet sonucu neonikotinoitlerin IC₅₀ değerleri 0,65 - > 4 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerinde ise IC₅₀ değerleri 0,40 - > 4 mM olarak belirlendi. Neonikotinoitlerin SH-SY5Y hücrelerine kıyasla HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilen neonikotinoit grubu insektisitlerin insan ve çevre sağlığı üzerine toksik etkileri ile ilgili araştırmaların çoğaltılması ve kullanımları konusunda gerekli tedbirlerin alınması hususlarına dikkat çekeceğine inanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Neonikotinoitler, HepG2 hücreleri, SH-SY5Y hücreleri MTT testi, Nötral kırmızısı testi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 50347.

ABSTRACT

Kılınç, A. (2015). Investigation of Cytotoxic Effects of Neonicotinoid Insecticides. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Master Thesis. Istanbul.

Due to low cost and easy to apply, the use of pesticides have been preferred in combating with plant diseases, pests and weeds which cause loss of significant amounts of the product or product quality at postharvest storage and agricultural production times. Because of unconscious, incorrect applications of pesticides by manufacturers at harvest, close to harvest period, consumption of pesticides more than need to get more and high quality products, high levels of drug residues are found on foodstuffs. Recent studies show that besides chronic toxic effects such as affecting nervous system, disrupting endocrine system, there are mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects have been reported. Neonicotinoids are relatively new type of insecticide, used in the last 20 years to control a variety of pests. Neonicotinoids are systemic and share a common mode of action that affect the central nervous system of insects, resulting in paralysis and death. Neonicotinoids can also be persistent in the environment, and when used as seed treatments, translocate to residues in pollen and nectar of treated plants. The potential for these residues to affect bees and other pollinators remain uncertain. Thus they can have harmful effects on environmental health. The aim of this Master Thesis investigation of the possible cytotoxic effects of common neonicotinoid insecticides (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam) on hepatocellular carcinoma and neuroblastoma cells by using MTT and NRU methods. It is shown that IC_{50} values of neonicotinoids in SH-SY5Y cells in the range of 0,65 - > 4 mM, while in HepG2 cells in the range of 0,40 - > 4 mM after 24 and 48 h exposure. HepG2 cells are more sensitive to cytotoxicity of neonicotinoids than SH-SY5Y cells. It is believed that these obtained results, will draw attention to expand researches on toxic effects of neonicotinoid insecticides which are identified as cytotoxic for human and environment health. And also to take necessary precautions for usage of these compounds.

Key Words: Neonicotinoids, HepG2 cells, SH-SY5Y cells, MTT test, Nötral red uptake test

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 50347.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler, böcekler, bakteriler, mantarlar ve diğer organizmalar çevrenin doğal bir parçasıdır. Bazıları birçok yolla insanlara fayda sağlamakta bazıları ise zararlı olabilmektedir. Bu durumda zararlıyı kontrol altında tutmak gerekir. Bu zararlıları kontrol etmek için kullanılan en yaygın metodlardan biri pestisit kullanımıdır. Pestisitler, Çevre Koruma Ajansı (EPA, 'Environmental Protection Agency') tarafından herhangi bir zararlıyı uzaklaştırmak, azaltmak, baskılamak ya da bozmak için kullanılan bir madde ya da madde karışımı olarak tanımlanmaktadır. Pestisit, kimyasal bir madde ya da virüs ve bakteri gibi biyolojik ajan olabilmektedir (EPA, 2006). Pestisitler, sentetik olarak üretildiği gibi doğal kaynaklardan da elde edilmektedir. Pestisitler, amacına uygun olarak uygun dozlarda ve koşullarda kullanıldıklarında oldukça yararlıdırlar. Fakat yanlış ve aşırı dozlarda kullanımı hem insan sağlığına zarar vermekte, hem de çevre kirliliğini arttırarak diğer canlıları da olumsuz yönde etkilemektedir. İnsanlar doğrudan ya da dolaylı olarak pestisite maruz kalabilmektedir. Özellikle, pestisit uygulanmış meyve ve sebzeleri tüketen insanlar yüksek oranlarda pestisite maruz kalmaktadırlar. Pestisitlerin vücuda giriş yolları ağız, deri ve solunum yoluyla gerçekleşmektedir (Nesheim ve ark.2005). Son yıllarda yapılan araştırmalarda pestisitlerin kalıntı yoluyla alınmaları durumunda sinir sistemini etkileyici, endokrin sistemi bozucu gibi kronik toksik etkilerinin yanı sıra (Gilden ve ark., 2010; McKinlay ve ark., 2008) lösemi (Brown ve ark., 1990; Blair ve Zahm, 1995), mesane kanseri (Viel ve Chalier, 1995), non-hodgkin's lenfoma (Waddel ve ark., 2001), pankreas kanseri (Jii ve ark., 2001) ve parkinson (Jenner, 2001) gibi kanser ve genetik hastalıklara yol açtığı rapor edilmiştir. Ayrıca, Garcia ve ark. (1998) tarafından, pestisitlere maruz kalan anne-babaların çocuklarında doğuştan gelen bozukluk (teratojenik etki) riskinin arttığı bildirilmiştir.

Pestisitlerin aynı türlerinin geniş ölçüde ve yıllarca kullanımı birçok böcek popülasyonunun bu kimyasallara karşı hassasiyetini kaybederek dirençli hale gelmesine neden olmuştur. Bu yüzden kullanılan pestisitlerin devamlı olarak yenilenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bunun sonucu olarak organoklorlu ve organofosforlu insektisitlerin uygulanması zamanla azalmış ve onlara alternatif olarak düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteye sahip ve çevre için daha az risk taşıyan

neonikotinoitler artan bir hızla kullanılmaya başlanmıştır (Kovganko ve Kashkan, 2004).

Neonikotinoit grubu insektisitler nikotin türevleri olup, N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran, ve klotianidin) ve N-siyanoaminidler (asetamiprid ve tiyakloprid) olarak sınıflandırılırlar (Bolboaca ve Jaentschi, 2005). Neonikotinoit grubu insektisitler, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de birçok ürünün korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu grup insektisitlerin tohum kaplamada düşük miktarlarda kullanılması, taşınması, uygulanması, depolanması, maliyetinin düşük olması ve tohum fidelerinde son derece etkili olması bakımından diğer insektisitlere göre daha üstün olduğu belirtilmektedir (Van Duyn, 2004).

Neonikotinoitler, hem memelilerde hem de böceklerde post-sinaptik membranda nikotik asetilkolin reseptöre (nAChR) bağlanırlar ve agonist olarak etki gösterirler (Tomizawa ve Casida, 2003; 2005). Neonikotinoitler, böceklere karşı yüksek toksisiteye fakat memelilere ve sucul organizmalara karşı düşük toksisiteye sahip insektisitlerdir (Kiryama ve ark., 2003). Çünkü neonikotinoitlerin memelilerdeki nikotik asetilkolin reseptöre (nAChR) ilgisi böceklerdekinden daha düşüktür (Tomizawa ve Casida, 2003; Nishiwaki, 2003). Neonikotinoitlerin nAChR’lerine bağlanma bölgelerindeki ve nAChR alt ünitelerindeki yapısal farklılıklar bu farklı ilgiden sorumludur (Casida ve Quistad, 2004).

Neonikotinoitler, tüm dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunmasında kullanılan en yeni insektisit grubu olup (Casida ve Quistad, 1998), EPA tarafından 2. ve 3. sınıf toksinler grubunda sınıflandırılmıştır (EPA, 2003; WHO, 2009). Son yıllarda neonikotinoit grubu pestisitlerin kullanımına kısıtlamalar getirilmiştir. Avrupa Birliği Komisyonu arılar üzerindeki negatif etkileri ortadan kaldırmak amacıyla neonikotinoit grubu klotianidin, imidakloprid ve tiyametoksamın 1 Aralık 2013’ten itibaren kullanımını kısıtlamıştır (<http://www.tarim.gov.tr/ABDGM/Belgeler/AB%20UYUM/bulten/14.pdf>).

Neonikotinoitlerin tarımsal mücadelede faydalarının yanı sıra karsinojenik risk taşıyabilmesi, karaciğer, hormonal ve üreme sistemi üzerine kronik toksik etkiler oluşturması (Colosio ve ark.,2005) nedeniyle tez çalışmasında sıklıkla kullanılan neonikotinoit grubu insektisitlerin (imidakloprid, tiyametoksam, klotianidin, asetamiprid ve thiakloprid) insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) ve nöroblastoma

(SH-SY5Y) hücreleri üzerindeki sitotoksisite potansiyellerinin [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] (MTT) ve nötral kırmızısı alımı (NRU) testleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle neonikotinoit grubu pestisitlerin çeşitli sistemlerde sitotoksisitelerinin araştırılması ile bu grup maddelerin toksisite çalışmalarına katkıda bulunulması insan ve çevre sağlığı açısından risklerinin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

Pestisitler, tarımdaki verimliliği artırmak amacıyla zararlıları uzaklaştırmak, azaltmak, baskılamak ya da bozmak için kullanılan kimyasal madde ya da madde karışımlarıdır. (EPA, 2006). Pestisitler, kullanıldıkları zararlılara, zararlılara etki şekillerine, etken maddesine göre değişik şekillerde sınıflandırılmaktadır (Wood, 2010). Mücadele edilen zararlı grubuna göre sınıflandırma şekli Tablo 2-1’de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Pestisitlerin mücadele edilen zararlıya göre sınıflandırılması (Wood, 2010).

Pestisit grubu	Etkili olduğu zararlı grubu	
İnsektisit	Böcekler	Organik fosforlular (Malatyon) Organik klorlular (Endosülfan) Karbamatlar (Karbaril) Sentetik piretroidler (Sipermetrin) Benzoil üreler (Klorfluazuron) Neonikotinoitler (Asetamiprid) Diğerleri (Amitnaz, Avermektinler, Dietil-m-toluamid)
Herbisit	Yabani otlar	Fenoksi bileşikler (MCPA) Karbamatlar (Klorprofam) Üre bileşikler (Diüron, Liüron) Sülfonil üreler (Klorsülfüron) Anilinler (Trifluralin) Amidler ve Anilidler (Asetoklor) Benzoik asitler (Dikamba)
Fungisit	Mantarlar	Benzimidazoller (Karbendazim) Piperazinler (Triforin) Strobilurin bileşikler (Florokzastrobin) Morfolin bileşikler (Dimetomorf) Pirimidinler (Etirimol) Triazoller (Prokloraz, Tebukonazol, Triadimefon, Triadimenol)
Rodentisit	Kemirgenler	Bradifakoum, Komaklor, Çinko fosfür
Nematosit	Bitki parazitleri	Kadusafos, Dazomet, Dikloropropan

Pestisit kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. Önceleri bitkilerin korunması doğal kaynaklı organik ve inorganik maddeler ile yapılmaktaydı. II. Dünya savaşından sonra sentetik pestisitlerin üretiminin artması ve bu maddelerin tarımsal

üretimde verimliliği yükseltmesi sebebiyle pestisitlerin yoğun olarak kullanılmasının önünü açmıştır. İlk olarak organofosforlu insektisit olan tetraetilpirofosfat (TEPP) 1938 yılında Bernard Shrader tarafından keşfedilmiştir. İlk organoklorlu insektisit olan diklorodifeniltriokloroetan (DDT) ise 1874 yılında sentezlenmiş, 1939 yılında Paul Müller tarafından insektisit özelliği keşfedilmiştir. (Worthing, 1987). 1940'lerden başlayıp 1970'li yıllara kadar DDT yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak bu pestisitlerin kullanımı zararlıları kontrol altına alırken aynı zamanda faydalı organizmaların da ortadan kalkmasına sebep olmuş, DDT ile kontamine yemleri yiyen balık, kuş ve memelilerin zarar görmesine neden olmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1973 yılında DDT kullanımı yasaklanmıştır (Martin, 1996).

Pestisitlerin kullanımı bir taraftan tarımsal verimi artırırken diğer taraftan bilinçsiz ve hatalı kullanımı doğrudan veya dolaylı yollarla insan ve çevre sağlığı sorunlarını beraberinde getirmektedir. Pestisitler tavsiye edilen dozların üzerinde kullanıldıklarında, gereğinden fazla sayıda ilaçlama yapıldığında, gerekmediği halde birden fazla ilaç karıştırılarak kullanıldığında veya son ilaçlama ile hasat dönemi arasında bırakılması gereken süreye uyulmadığı durumlarda gıda maddelerinde fazla miktarda kalıntı bırakabilirler. Yüksek dozda pestisit kalıntısı içeren gıdalarla beslenen insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olabildikleri gibi, özellikle bazı ürünlerde aroma ve kalite değişimlerinde oluşturabilmektedirler (Heming ve ark., 1954).

Pestisitlerin vücuda giriş yolları oral yol, deri yolu ve solunum yoluyla gerçekleşmektedir (Nesheim ve ark., 2005). Doğada tüm insanlar doğrudan ya da dolaylı olarak pestisitelere maruz kalabilmektedir. Bunlardan en çok pestisit üretiminde ve uygulamasında çalışan işçiler ile pestisit uygulanmış meyve ve sebzeleri tüketen insanlar yüksek oranlarda pestisite maruz kalmaktadırlar. Aynı zamanda, pestisitlerin kullanımı çeşitli canlıların zarar görmesine sebep olmakta ve bu canlılar ile beslenen diğer canlıların da olumsuz etkilenmelerine yol açarak besin zincirinde kırılmalara neden olmaktadır (Delen ve ark., 2005).

2.1.1. İsektisitler

İsektisitler, günümüzde tarımsal arazilerden yüksek verim elde edebilmek amacıyla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır ve pestisitler içinde yaygın olarak kullanılan gruptandır. İsektisitler kimyasal yapılarına ve etki

mekanizmalarına göre farklı gruplar altında sınıflandırılırlar. Bu gruplar başlıca; organoklorlu insektisitler, organofosforlu insektisitler, karbamatlar, piretroitler ve neonikotinoit grubu insektisitlerdir.

Organoklorlu insektisitler, genellikle karbon-hidrojen içeren organik maddelerin (alifatik veya aromatik) klorlanmasıyla elde edilir (Gündüz, 1998). Bu şekilde formüle edilmiş insektisitler, kimyasal stabiliteleri ve yağda çözünürlükleri yüksek, biyotransformasyon ve yıkımları yavaş, uçucu özellikleri az olan insektisitlerdir. DDT başta olmak üzere bazı klorlu hidrokarbonlar, tarım ve sağlık programlarında uzun süreli kalıcılıkları ve diğer bileşiklere kıyasla daha az akut toksisiteye neden olmalarından dolayı yaygın olarak kullanılmışlardır. Ancak çevrede kalıcılıkları sonucu besin zincirine karışıp çevre sorunlarına yol açtıkları için kullanımları yasaklanmıştır (Echobichan, 1996; Marrs ve Dewhurst, 2000).

Kuşlar başta olmak üzere birçok canlıda böbrek, karaciğer, sinir sistemi gibi dokularda pestisit birikimine bağlı ölümlere sebep oldukları belirlenmiştir. Ölümle sonuçlanmayan durumlarda ise üreme sisteminde toksik etki göstermişlerdir (Preziosi, 1998; European Commission, 1999).

Birçok zararlı etkilerinden dolayı organoklorlu insektisitlerin kullanımı T.C. Tarım Köyişleri Bakanlığı tarafından yasaklanmıştır. Bundan dolayı diğer insektisit gruplarından karbamatlar ve organofosforlu insektisitler daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır (Kaya ve ark., 1998).

Organofosforlu insektisitler, çabuk parçalanmayan ve yüksek toksisiteye sahip fosforik asit türevleridir. Organofosforlu insektisitlerin en önemli özellikleri asetilkolin gibi davranarak asetilkolin esteraz enzimi ile etkileşime girmeleridir. Asetilkolin parçalanamadığı için sinapslarda asetilkolin birikimi artar ve sinirsel iletim durur. Sonuçta “asetilkolin zehirlenmesi” denilen olay görülür. Asetilkolin artışı sonucunda çizgili kaslarda kasılmalar, parasempatik sistemin aşırı çalışması, kalbin uyarılmasına bağlı olarak kan basıncında artış ve felç gibi durumlar gözlenmektedir.

Karbamat grubu pestisitler, karbamik asidin organik esterleri veya tuzlarıdır. 1925 yılında yapısı tespit edilmiş ve 1935 yılında da sentezi yapılmıştır. Karbamatlar, bazı özelliklerinden dolayı organofosforlu insektisitlere benzerler fakat iki yönüyle farklılık göstermektedirler. Birinci özellik asetilkolin esteraz enzimi ile kompleks oluşturabilen bazik özellikte bir azot grubu taşımalarıdır. Organofosforlu insektisitlerde

bu grup bazik özellikte değildir. Bu durumda iyonize olabilecekleri için böceklerin kutikulasına ve sinirlerin kılıfına geçiş yetenekleri önemli derecede azalma göstermektedir. İkinci önemli fark ise, asetilkolin esteraz inhibisyonu esasına dayanan etkilerinin hızlı şekilde geri dönüşümlü olmasıdır (Yavuz ve Şanlı, 1999). Karbamat insektisitlerinin asetilkolin esteraz inhibisyonu kendiliğinden ve hızlı şekilde geri dönüşümlü olduğu için toksik etkisi kısa sürelidir (Lima ve ark., 1991).

Piretroit grubu insektisitlerin kullanımı 1880’li yıllarda *Pyrethrum* cinsine ait bazı bitkilerin çiçeklerinin öğütülmesi ile elde edilen piretrum ekstratındaki piretrin maddesinin insektisit olarak kullanılması ile başlamıştır. I. ve II. piretrin bu ekstratın %73’nü oluşturmaktadır. Doğal piretrumların insektisit olarak birçok avantajları bulunmaktadır. Bu avantajları; geniş spektrumlu olmaları, memelilerde zehirliliklerinin ihmal edilebilir düzeyde olması ve doğal ortamda kısa sürede parçalanmalarıdır. Fakat üretim maliyetinin yüksek olması, kolay bozunması, üretiminin sürekli olmasındaki zorluklar doğal piretroitlerin kullanımını sınırlandırmıştır. Ticari olarak pazarlanan tüm piretroit etkili maddeler lipofilik olup, suda çözümlülükleri ve buhar basınçları düşüktür. Bu özelliğinden dolayı klorlanmış hidrakerbon insektisit grubuna benzemektedirler. Ancak, ester bağlarının hidrolizi veya oksidasyonla oldukça kolay metabolize olmalarından dolayı çevre sorunlarına neden olmamaktadırlar (Ünal ve Gürkan, 2001).

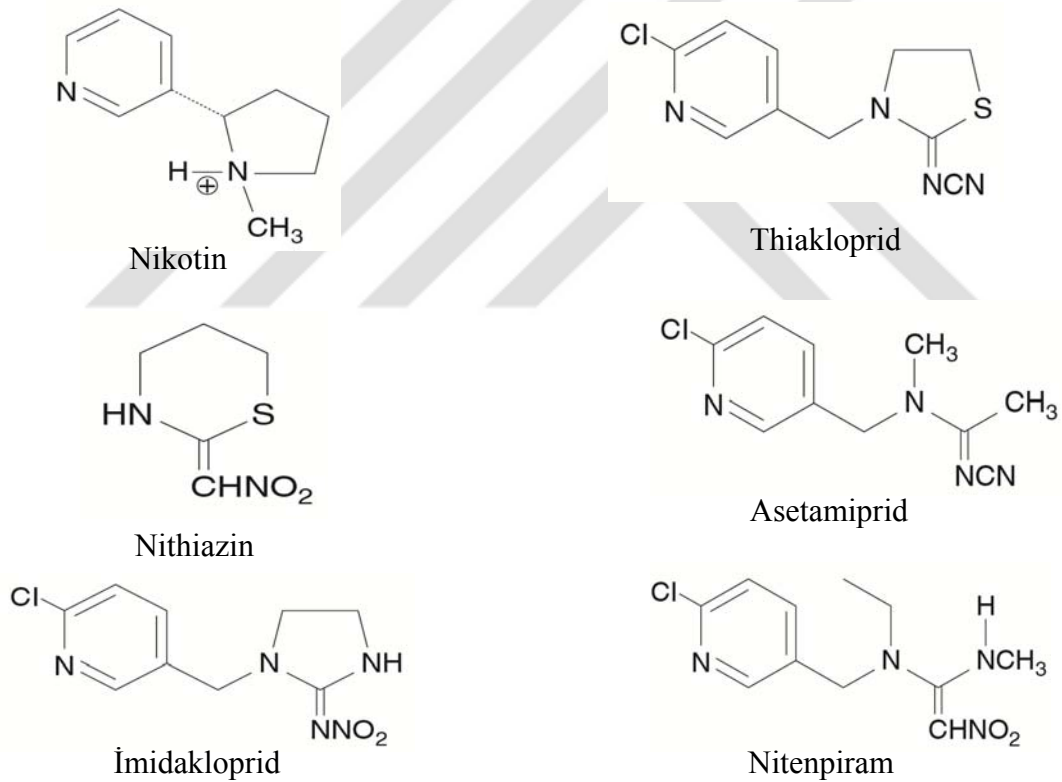
Diğer kimyasal sınıflardan olan böcek gelişim engelleyicileri ve böcek gelişim düzenleyicileri seçicilikleri ve özel etki şekilleri ile son zamanlarda adından söz ettirmektedir. Bu insektisitler böceklerin vücutlarından salgılanan ve gelişimleri için ihtiyaç duydukları doğal hormonların dengelerini bozarak böceklerin büyüme ve gelişimlerini durdurarak bu böceklerin verdikleri zararların önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Böcek büyüme düzenleyicilerine en iyi iki örnek juvenil hormon ve benzoilüre türevleridir (Dursun ve ark., 2008).

2.1.2. Neonikotinoit Grubu İsektisitler

Pestisitlerin geniş ölçüde ve yıllarca kullanımı birçok böcek popülasyonunun bu kimyasallara karşı hassasiyetini kaybederek dirençli hale gelmesine neden olmuştur. Bu yüzden kullanılan insektisitlerin devamlı yenilenmesi gerekmektedir. Çevrede yüksek derecede kalıcılığa sahip olan organoklorlu insektisitler ve akut toksisiteyi fazla olan organofosforlu insektisitlerin yerine, düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteye sahip ve çevre için daha az risk taşıyan neonikotinoit grubu insektisitler artan oranlarda

kullanılmaya başlanmıştır (Kovganko ve Kashkan, 2004). Neonikotinoit grubu insektisitler, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de birçok ürünün korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunmasında kullanılan en yeni insektisit sınıfı olup (Casida ve Quistad, 2004), EPA tarafından 2. ve 3. sınıf toksinler grubunda sınıflandırılmıştır (EPA, 2003; WHO, 2009).

Neonikotinoitler çoğunlukla emici böcekleri ve bazı kelebekler ile kın kanatlı zararlıları kontrol etmek için kullanılmaktadır (Casida ve Quistad, 2004). Bu grup insektisitler nikotin türevleri olup, N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran, ve klotianidin) ve N-siyano-aminidler (asetamiprid ve thiakloprid) olmak üzere sınıflandırılırlar (Bolboaca ve Jaentschi, 2005). Nikotin ve neonikotinoit grubu bazı pestisitlerin kimyasal yapısı Şekil 2-1’de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Nikotin ve neonikotinoit grubu bazı pestisitlerin kimyasal yapısı.

Neonikotinoit grubu insektisitler nikotinin asetilkolin resöptörlerinin selektif agonistleridir. Bunlar hem memelilerde hem de böceklerde post-sinaptik membranda nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanırlar ve agonist olarak etki gösterirler (Tomizawa ve Casida, 2003). Böcekler karşı yüksek toksisiteye, memelilere ve sucul

organizmalara karşı düşük toksisiteye sahiptirler (Kiryama ve ark., 2003). Çünkü neonikotinoitlerin memelilerdeki nikotink asetikolin reseptörlere ilgisi böceklerdekenden daha düşüktür (Tomizawa ve Casida, 2003).

Neonikotinoit biyotransformasyonlarında karaciğer mikrozomal sitokrom p450 enzimleri ve sitozolik aldehit oksidazlar rol oynarlar (Honda ve ark., 2006). Yapılan çalışmalar, asetamipridin bal arılarının farklı vücut kısımlarına hızlı bir şekilde dağıldığını ve hemen yedi metabolite parçalandığını göstermiştir. Metabolitlerin tüm vücut kısımlarında bulunması asetamiprid metabolizmasının sadece detoksifikasyon sistemi olan bağırsakta değil balarısının tüm organlarında olduğunu göstermiştir. Asetamiprid temel olarak oksidazlar tarafından daha polar olan metabolitlerine dönüşür ve vücuttan atılmaya hazır hale gelir (Brunet ve ark. 2008). Fakat memelilerdeki asetamipridin metabolizmasına ait çalışmalar henüz bulunmamaktadır. İmidakloprid toprak böcekleri, emici ve delici böcekler ile termitleri kontrol etmek üzere kullanılan bir insektisittir. İmidakloprid genel olarak memelilere düşük akut ve kronik toksisiteyi göstermektedir. Memelilerdeki toksikolojik önemi metabolizmasından ileri gelmektedir ve biyotransformasyonu bazı aktivasyon reaksiyonlarını içerir.

Neonikotinoit grubu insektisitlerin özellikle DNA hasarı (Bull ve ark., 2006), kardeş kromatid değişimi (Rupa ve ark., 1991), mikroçekirdek oluşumu (Van Maele-Fabry and ark., 2007), kromozal anormallikler (Rupa ve ark., 1988), DNA kırıkları ve DNA adduktlarına (Peluso ve ark., 1996) neden olduğu belirtilmiştir. Çeşitli epidomiyolojik çalışmalar DNA hasarının sinir, solunum, üreme ve bağışıklık sistemi bozukluklarına (Colosio ve ark., 2005), tümörlerin gelişimine (Dich ve ark.,1997) sebep olduğunu göstermiştir. Özellikle, thiakloprid karsinojendir ve farelerde yumurtalık tümörü oluşturduğu tespit edilmiştir. (EPA, 2003; WHO, 2009). Tiyametoksam karsinojendir ve dişi erkek farelerde karaciğer tümörlerine neden olmaktadır (Green ve ark., 2005). Asetamiprid kardeş kromatid değişimine, kan lenfositlerinde mikro çekirdek oluşumuna ve kromozal anormalliklere neden olmaktadır (Kocaman ve Topaktas, 2007.). Bu grup insektisitler ile zehirlenme vakaları da gözlenmiştir (Mohamed ve ark., 2009; Imamura ve ark., 2010).

Son yıllarda neonikotinoit grubu pestisitlerin kullanımına kısıtlamalar getirilmiştir. Avrupa Birliği Komisyonu arılar üzerindeki negatif etkileri ortadan kaldırmak amacıyla neonikotinoit grubu klotianidin, imidakloprid ve tiyametoksamın 1

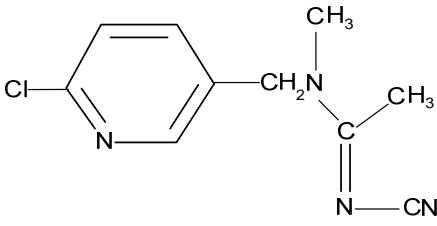
Aralık 2013'ten itibaren kullanımını kısıtlamıştır (<http://www.tarim.gov.tr/ABDGM/Belgeler/AB%20UYUM/bulten/14.pdf>).

Neonikotinoit grubu insektisitlerden yaygın olarak asetamiprid, imidakloprid, tiyametoksam, thiakloprid ve klotianidin kullanılmaktadır.

2.1.2.1. Asetamiprid

Asetamiprid, neonikotinoit grubunda üretimine başlanan ikinci bileşik olup, ilk kez Mospilan ticari adı ile Japonya'da satışa sunulmuştur (Yamamoto ve ark., 1999). Asetamiprid, yapraklı ve meyveli sebzeler, narenciye, pamuk, süs bitkisi ve çiçeklerinin üzerinde bulunan emici türdeki böcekleri kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu, 'Food and Agriculture Organization of the United Nations' FAO, 2011). Asetamiprid'in fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri Tablo 2-2'de verilmiştir (Avrupa Birliği Komisyonu, 'European Commission', EC, 2004).

Tablo 2-2: Asetamipridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EC, 2004).

Kimyasal adı (IUPAC)	(E) -N1 - [(6-kloro-3-piridil) metil] -N2 -siyano- N1 - metilasetamidin
Molekül yapısı	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄
Molekül formülü	
Molekül kütlesi (g/mol)	222,68
Ticari ismi	Mospilan
Sudaki çözünürlüğü (g/L, 25°C, pH 7)	2,95
Fiziksel durumu	Saf halde kokusuz, beyaz toz haldedir
NOEL (mg/kg, günde)	12,4
LD ₅₀ (mg/kg, memeli, akut oral)	Erkek: 417; Kadın: 314
ADI (mg/kg, vücut ağırlığı/gün)	0,07

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği; LD₅₀: Ortalama letal doz; NOEL: Hiçbir toksik etki gözlenmeyen doz; ADI: Günlük alınmasına izin verilen doz.

Zararlı böceklerle karşı etkili olmakla birlikte bal arıları gibi hedefte olmayan bazı canlılara zarar verdiği bildirilmiştir (El Hassani ve ark., 2008). Asetamipridin

yaklaşık %96'lık kısmı oral yol ile 24 saat içinde emilime uğramaktadır. Karaciğer, böbrek ve tiroidlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Vücutta birikme potansiyeli düşüktür. Oral uygulamalarda 96 saat sonra asetamipridin %90'ının idrarla atıldığı gösterilmiştir (EC, 2004).

Asetamiprid memelilerde sitotoksik ve genotoksik özellik gösterir (Çavaş ve ark., 2012). Bu duruma oksidatif hasara sebep olan reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu gösterilmiştir (Yao ve ark., 2006). Ayrıca, asetamipridin insan periferik lenfosit kültürlerinde kardeş kromatid değişimlerine, kan lenfositlerinde mikro çekirdek oluşumuna ve kromozal anormalliklerine sebep olduğu belirtilmiştir (Kocaman ve ark., 2007). Memelilerde düşük dozlarda bile nörotoksik olarak lökomotor aktiviteyi indirdiği bildirilmiştir (EC, 2004).

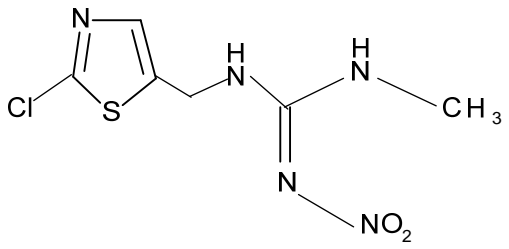
Asetamiprid, tiyametoksam ve imidaklopid ile karışım oluşturarak böceklere uygulandığında elde edilen karışımın toksisitesinin imidaklopride göre daha çok, tiyametoksama göre ise daha az olduğu bildirilmiştir (Rust ve ark., 2008).

2.1.2.2. Klotianidin

Mısır ve kanola üzerinde bulunan klotianidin düşük seviyelerde bile toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Klotianidin bal arıları üzerinde kronik maruziyeti sonucu toksisiteye sebep olabileceği ve aynı şekilde hedefte olmayan polen taşıyıcı böceklerde, bitkilerin nektar ve polenlerinde birikime sebep olabileceği gösterilmiştir. Yeryüzünde veya suda yaşayan sucul damarlı damarsız bitkilerde, tatlı su ve deniz balıklarında klotianidin akut veya kronik bir riskinin bulunmadığı gösterilmiş olup, sucul omurgasızlarda ise toksik olduğu bildirilmiştir (EPA, 2003a).

Klotianidin ile kontamine olmuş gıdalar nesli tükenme tehlikesinde olan canlılar için büyük risk taşımaktadırlar. Özellikle, klotianidinle kontamine olmuş mısır ve kanola yemleri, polen ve nektarlı besinleri tüketen canlıların yaşamı tehlikeye girmektedir (EPA, 2003). Klotianidin'in fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri Tablo 2-3'de gösterilmiştir (EPA, 2003).

Tablo 2-3: Klotianidinin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EPA, 2003a).

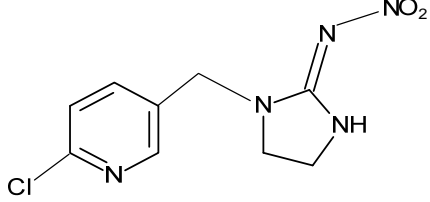
Kimyasal adı (IUPAC)	(E) -1- (2 - kloro-1,3- tiazol- 5 -ilmetil) -3-metil - 2 -nitroguanidin
Molekül yapısı	
Molekül formülü	C ₆ H ₈ ClN ₅ O ₂ S
Molekül kütlesi (g/mol)	249,7
Sudaki çözünürlüğü (mg/L, 20 °C)	327
Ticari ismi	Poncho 600
Fiziksel durumu	Kokusuz, berrak ve renksiz toz halde
NOEL(mg/kg, oral, fare)	27,9 ile 34,0
LD ₅₀ (mg/kg, memeli, akut oral)	500 < LD ₅₀
ADI (mg/kg, vücut ağırlığı/gün)	0,097
Toksikoloji kategorisi	III

2.1.2.3. İmidakloprid

İmidakloprid, neonikotinoit bileşenler sınıfına ait yeni bir insektisit (El-Gendy ve ark., 2010). İmidakloprid toprak böcekleri, arılar, termitler, beyaz sinekler gibi emici böceklerin kontrolü amacıyla ağaç yaprakları, tohum ve toprakta kullanılırlar. İmidaklopridin ışığa dayanıklı olması ve böceklerde yüksek toksisite göstermesi, dünyada yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Kagabu, 1997). İmidaklopridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (FAO, 2013; Ulusal Pestisit Bilgi Servisi, 'National Pesticide Information Center', NPIC, 2013) Tablo 2-5'de gösterilmiştir.

İmidakloprid etkileri ve yapıları bakımından tiyametoksama benzer. Düşük konsantrasyonlarda bile emici özellikteki yaprak bitleri ve bu tür zararlılar gibi böcekler üzerinde kuvvetli etki göstermektedir (Manson ve ark., 2000). EPA tarafından imidaklopridin omurgalılar ve hedefte olmayan omurgasızlar üzerinde düşük akut toksisiteye sahip olduğu belirtilmiştir. İmidakloprid esas olarak karacigerde metabolize edilir.

Tablo 2-4: İmidaklopridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (FAO, 2013; NPIC, 2013).

Kimyasal adı (IUPAC)	1- (6- kloro-3 -piridilmetil) -N-nitroimidazolidin - 2 - ylidenamin
Molekül yapısı	
Molekül formülü	C ₉ H ₁₀ Cl N ₅ O ₂
Molekül kütlesi (g/mol)	255,7
Ticari isimleri	Gaucho, Zelmone
Sudaki çözünürlüğü (mg/L, 20°C)	610
Fiziksel durumu	(Saf halde) renksiz kristal yapıda, karakteristik koku
NOEL(mg/kg, günde)	5,7
LD ₅₀ (mg/kg, memeli, akut oral)	450
ADI (mg/kg, vücut ağırlığı/gün)	0,06

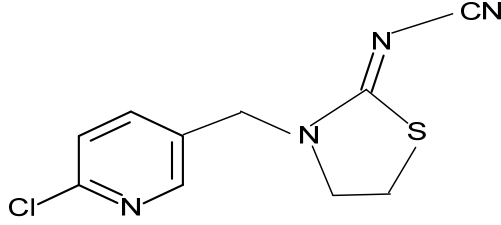
Sıçanlar üzerine yapılan çalışmada, erkek sıçanlara üç ay boyunca her gün 14, 61 ve 300 mg/kg vücut ağırlığı, dişi sıçanlara ise 20, 83 ve 420 mg/kg vücut ağırlığı imidakloprid uygulandığında; erkek sıçanlarda 61 mg/kg, dişilerde ise 420 mg/kg dozlarda vücut ağırlıklarının azaldığı, karaciğer hasarlarının olduğu ve kan pıhtılaşma fonksiyonlarında düzensizlik olduğu tespit edilmiştir (Eiben ve Rinke, 1989).

İmidakloprid içeren ürünler insanlarda deri maruziyeti sonucu deride aşırı duyarlılık oluşturmaktadır (Wisner ve ark., 2004). Bunun dışında imidaklopridin insanlar üzerindeki etkisi hakkında bir bilgi bulunmamıştır. Fakat kaydedilen intihar vakalarından birinde 69 yaşında bir kadının %9,6 imidakloprid içeren bir ürünü ağız yolu ile alması sonucu bireyde maruziyetten sonra terleme, kusma, kalp atışında hızlanma gibi belirtiler görülmüş, kalp üzerine toksik etkiler gerçekleşmiş ve bireyin 12 saat sonra ölümü raporlanmıştır (Huang ve ark., 2006).

2.1.2.4. Thiakloprid

Antep fıstığı, fındık gibi sert kabuklu meyvelerin de dahil olduğu pek çok meyvede, sebzelerde, tahıllarda, ayçiçeği ve pamukta zararlılarla mücadelede kullanılan bir insektisittir. Tablo 2-5’de thiclopridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri verilmiştir (EC, 2004).

Tablo 2-5:Thiaklopridin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EC, 2004).

Kimyasal adı (IUPAC)	(Z)-N- {3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2- yliden}cyanamide
Molekül yapısı	
Molekül formülü	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S
Molekül kütlesi (g/mol)	252,73
Ticari ismi	Calypso
Sudaki çözünürlüğü (mg/L, Ph7 20°C)	185
Fiziksel durumu	Kristal toz halinde, sarımsı, kokusuz
NOEL (mg/kg, günde)	100
LD ₅₀ (mg/kg, memeli, akut oral)	Erkeklerde 621-836 Kadınlarda 396-444
ADI (mg/kg, vücut ağırlığı/gün)	0,01

Thiakloprid vücuda oral, dermal ve solunum yolu ile alınmaktadır. Maruziyetten yaklaşık 3-4 saat sonra plazmada en yüksek konsantrasyona ulaşmaktadır ve metabolik süreçlerden sonra hızla atıldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu thiaklopridin; böbrek, karaciğer, akciğer, tiroid, dalak ve deri gibi organlar başta olmak üzere tüm vücuda yayıldığı tespit edilmiştir. Yüksek dozlarda maruz kalındığında en yüksek kalıntı miktarının uygulamadan 48 saat sonra bulunduğu, dişilerin vücutlarındaki kalıntı miktarının erkeklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zirai ve Veteriner Kimyasalların Kaydı için Ulusal Otorite, ‘National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals’ APVMA, 2001; EPA, 2003).

Thiaklopridin alınmasından 48 saat sonra %90’nı boşaltım sistemi, geri kalanı sindirim sistemi ve çok az miktarı ise solunum sistemi tarafından atılır. Alınan dozun yaklaşık %60-80’i idrar ile, %39’u feçesle, yaklaşık %1’lik kısmı ise ekspirasyon havası ile dışarı atılır (APVMA, 2001; EPA, 2003b; ECB, 2008).

Thiaklopridin farklı dozlarında yapılan çalışmalarda kemirgenler ve kemirgen olmayan canlılarda hepatoksisite ve tiroid üzerine toksik etkilere sebep olduğu belirlenmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu canlılarda, motor ve lokomotor aktivitelerde azalma, göz kapağında sarkma, titreme, göz bebeklerinde

genişleme, arka ayakların kavrama gücünde azalma ve seksüel olgunlukta gecikme gibi nörotoksik etkilerinin olduğu belirtilmiş; ayrıca karaciğer enzimlerinde değişimler, kilo kaybı, adrenal bez değişimleri, cilt ve gözlerde tahriş, hepatosellüler hipertrofi ve ağırlık değişimleri, tiroid uyarıcı hormon seviyesinde artış, T3 ve T4 hormonları seviyelerinde artış ve azalışlar, tiroit bezinin ağırlığında değişimler, plazma üre seviyesinin ve tiroksin bağlama kapasitesinin yükselmesi, nefes darlığı, timüsün küçülmesi, retinal atrofi, lens dejenerasyonu, lökosit sayısında artış gibi değişimler tespit edilmiştir (APVMA, 2001; EPA, 2003b; ECB, 2008). Ayrıca, thiaklopridin karsinojenik olduğu ve farelerde yumurtalık tümörü oluşturduğu tespit edilmiştir. (EPA, 2003b; WHO, 2009).

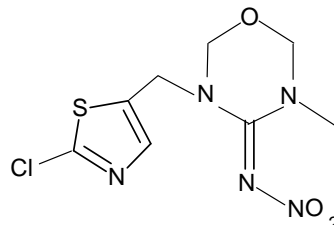
2.1.2.5. Tiyametoksam

Tiyametoksam geniş spektrumlu insektisit özelliğe sahiptir. Birçok ülkede sebze, süs bitkileri, tarla bitkileri, yaprak döken meyve, narenciye, pamuk ve pirinçlerdeki zararları ortadan kaldırmak amacıyla kullanılır (FAO, 2010). İmidakloprid ile tiyametoksam aynı etkiye ve benzer kimyasal yapıya sahip olan bileşiklerdir. Her iki madde emici haşerelere karşı kontakt yolu ile ve düşük konsantrasyonlarda alınması sonucu kuvvetli etki göstermektedirler (Manson ve ark., 2000; Elbert ve ark., 1991; Prabhaker ve ark., 1997). Tablo 2-5'te tiyametoksamın fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri verilmiştir (EC, 2006).

Memelilerde emilim hızlı gerçekleşmekte ve 24 saat içinde idrar (%94) ve feçesle (%4) atılmaktadır. Yüksek oranda dağılımı gerçekleşmekte ve en çok karaciğerde biriktiği gösterilmektedir. (EC, 2006).

EPA tarafından tiyametoksamın omurgalılar ve hedefte olmayan omurgasızlar üzerinde düşük akut toksisiteye sahip olduğu kayıt altına alınmıştır. Tiyametoksam uzun sürede karaciğerde ve böbreklerde toksik özelliğe sahiptir. Akut nörotoksisite çalışmalarında lokomotor aktiviteyi azaltır. Ayrıca, karaciğer enzimlerinin ve hepatosit çoğalmasının indüklenmesine ve yüksek dozlarda santral sinir sistemi depresyonuna neden olmaktadır (EC., 2006). Ayrıca farelerde *in vivo* ve *in vitro* olarak karaciğer tümörlerinde artış oluşturduğu ve dişi erkek farelerde karaciğer tümörlerine neden olduğu saptanmıştır (Green ve ark., 2005).

Tablo 2-5: Tiyametoksamın fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri (EC, 2006)

Kimyasal adı	3- (2 -Kloro- 5 -tiyazolimetil) tetrahidro- 5 -metil-N -nitro -4H -1,3,5- oxadiazin - 4 -imin
Molekül formülü	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S
Molekül yapısı	
Molekül kütlesi (g/mol)	291,71
Ticari ismi	Actara
Sudaki çözünürlüğü (g/L, 25 °C)	4.1
Fiziksel durumu	Hafif kremi, kokusuz,ince kristal toz formunda
NOEL(mg/kg, günde)	1.4
LD ₅₀ (mg/kg, memeli, akut oral)	1563
ADI (mg/kg, vücut ağırlığı/gün)	0.026

2.2. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde ayrıştırılmasına ve bunların bir besiyeri ortamında doku ile bağlantısı olmadan *in vitro* olarak çoğaltılmasına hücre kültürü adı verilmektedir (Davis, 1996). 1952’de insan serviks karsinomasından ilk devamlı hücre kültürü (Hela) elde edilmiştir. 1955–1960 yılları arasında, hücre kültürü çalışmalarında çok önemli bir adım atılarak günümüzde kullanılan anlamda temel hücre kültürü vasatları hazırlanmıştır (Freshney, 1986). Son 20 yıldır hücre kültürü, yalnızca spesifik araştırmalar için kullanılan bir araç olmaktan çıkarak, dünyanın en hızlı gelişen endüstri alanlarından biri olan biyoteknolojinin temel taşlarından biri haline gelmiştir.

Hücre kültürü üretmek için kullanılan ortamlarda hücresel metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması amacıyla gerekli maddeler ortama ilave edilir. Hücre üretme ortamları, hücrenin organlardan ayrılmasından sonra doku tabakası oluşana kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılmakta ve genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri içermektedir. Ortam içerisinde; glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineraller, şeker, tuz ve antibiyotikler yer almaktadır (Freshney, 1986; Davis, 1996).

Günümüzde, hücre kültürleri tek tabaka ve süspansiyon halinde hücre kültürleri olmak üzere iki yolla üretilmektedir. Tek tabaka hücre kültürleri; cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Hücre kültür malzemesinin yüzeyi, hücrelerin tutunma ve çoğalmalarını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli makromoleküller ile kaplanabilir. Bunlar, hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan integrin proteinleri ile etkileşerek dokuda var olan hücrelerarası matrikse benzer etki gösterirler. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde ise; hücreler yaşamsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürebilir. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde kültüre edilir. Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerini ele alarak klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerini yansıtan üç boyutlu kültür metodları da geliştirilmiştir. Bunların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtma sayılabilir (Freshney, 1986).

Hücre kültürleri; bireysel faktörlerden etkilenmemeleri, materyaller arasında parametrik karşılaştırmalara olanak tanımaları, tekrarlanabilme özellikleri, çalışma koşullarının standardize edilebilmesi gibi nedenlerden dolayı da tercih edilmektedir. Hücre kültürleri, günümüzde sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve toksikolojik çalışmalarda tanı veya araştırma amacıyla yoğun olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, hücre kültürleri hayvan deneylerinin yerini alması yolunda alternatif uygulamalar olarak da son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Ryan, 2008).

Hücre kültürlerinin dezavantajları olarak; birbirini izleyen pasajlarda hücreler farklılaşmakta ve her zaman bir miktar ölüm gerçekleşmektedir. Hücre kültürlerinde zamana bağlı bir kararsızlık söz konusu olabilir. Ayrıca, hücre kültürü testleri ile sadece materyallerin akut toksisite reaksiyonları konusunda bilgi edinilebilmekte, materyalin uzun süreli doku temasında oluşturacağı sitotoksisite düzeyi konusunda ise veri elde edilememektedir (Schmalz, 1994). Hücre kültürlerinde hijyen çok önemli olduğundan primer kültürlerin elde edildiği doku ve bunların bulunduğu koşullar hücre kültürlerini etkilemektedir. İn vitro çalışmalarda sterilizasyon, kültürlerin hazırlanması ve mikroskobik inceleme uzmanlık gerektirmektedir.

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri primer, sekonder ve devamlı hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

Primer hücre kültürleri

Primer hücre kültürü, organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücrelerden oluşmaktadır. Dokunun fizyolojik durumunu yansıtan bu hücreler, genotip ve fenotip olarak orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir. Primer hücre kültürleri ilk pasajdan sonra bir kültür ortamından diğerine taşınmaktadırlar. Bu işleme subkültür adı verilmektedir. Bu kültürlerde hücre soyu “sonlu”dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerle belirli sayıda pasajlama yapılabilirdiğinden; deneyleri bu dönemde yapmak gereklidir. Primer hücreler ile çalışılabilecek pasaj sayısı hücre tipine göre değişmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler; bu durumda aynı fonksiyonel özelliklere sahip hücre dizileri elde edilmiş olur. Primer hücre kültürleri genellikle hayvan serumu ve diğer bileşenler eklenmiş karışık besin medyumlarına ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla primer hücre kültür sistemlerini standardize etmek oldukça zordur. Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmışlardır (Özdemir, 2007).

Sekonder Hücre Kültürleri

Primer kültürlerden sonra hücreler ortalama 40-50 pasaj süresince fenotipik ve genotipik özellikleri değişmeden sabit bir oranda çoğalarak devam ettirilebilir. Bu dönemdeki hücrelere “diploid hücre kültürü” ya da “sekonder hücre kültürleri” adı verilir. Bu kültürlerdeki bütün hücreler, alındıkları dokunun karyotipini %85 oranında korumaktadırlar. Ancak, bu hücrelerde genellikle 30-40 pasaj arasında spontan bir farklılaşma ya da transformasyon gözlenmeye başlar. (Ryan, 2008).

Devamlı Hücre Kültürleri

Hücre dizileri, primer kültürlerden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek oluşturulan kültürlerdir. Primer hücre kültürleri transformasyona uğradığında ve süresiz olarak bölünme yeteneği kazandığında oluşurlar. Transforme hücreler genellikle daha hızlı ve daha kolay büyürler ve genellikle fazladan yani anormal kromozomlara sahiptirler. Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir. Transformasyonları nedeniyle fizyolojik özelliklerini

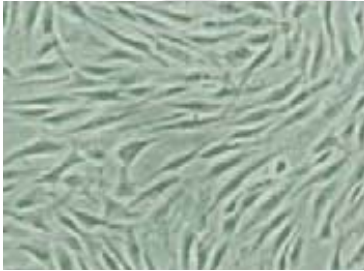
koruyamamaktadırlar. Tümör dokusundan da alınan hücrelerden de elde edilirler. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılan hücre dizileri “devamlı hücre dizisi” olarak kabul edilmektedirler. Hücre dizilerinin primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim göstermeleri ve sonsuz çoğalma yetenekleri olarak sıralanabilir (Freshney, 1994).

2.2.1. Hücre Kültür Koşulları

Kültür koşulları her hücre tipi için oldukça çeşitlidir. Hücreler, amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller gibi önemli besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin, hormonların, O₂ ve CO₂ gibi gazların, pH, ozmotik basınç, sıcaklık gibi düzenleyici fizikokimyasal çevrelerin olduğu uygun bir substrat ya da besiyeri ile kültüre alınır.

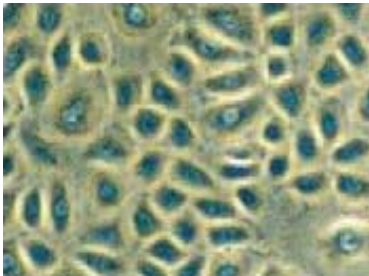
Hücrenin morfolojik durumu: Kültürdeki hücreler şekilleri ve görünümleri bakımından üç ana kategoriye ayrılırlar:

Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler, bipolar ya da multipolar olup uzamış şekle sahiptirler ve substrata tutunarak büyürler (Şekil 2-12).



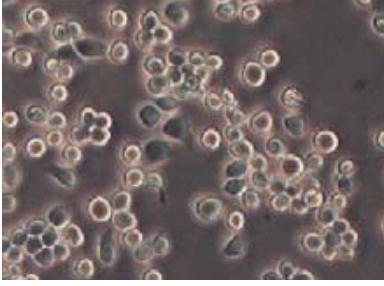
Şekil 2-2: Fibroblastik (veya fibroblast benzeri) hücreler (Freshney, 1994).

Epitelyal benzeri hücreler çokgen biçimli olup daha muntazam boyutlara sahiptir ve substrata tutunarak büyürler (Şekil 2-13).



Şekil 2-3: Epitelyal benzeri hücreler (Freshney, 1994).

Lenfoblast benzeri hücreler küre şeklinde olup genellikle yüzeye tutunmaksızın süspansiyonda büyütülürler (Şekil 2-14).



Şekil 2-4: Lenfoblast benzeri hücreler (Freshney, 1994).

Besiyeri: Besiyeri, kültür çevresinin en önemli bileşenidir. Çünkü kültür için düzenleyici pH ve ozmotik basıncın yanı sıra gerekli besin maddelerini, büyüme faktörlerini, hücre büyümesi için gereken hormonları sağlar. Önceleri hücre kültürü deneylerinde doku ekstraktlarından, vücut sıvılarından elde edilen doğal besiyeri kullanılmasına rağmen, standardizasyona ihtiyaç duyulduğu için besiyerlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Serum ilavesi ihtiyacına göre sınıflandırılmış üç temel besiyeri kullanılır. Bunlar; bazal besiyeri, azaltılmış serumlu besiyeri ve serumsuz besiyeridir.

Serum, bazal besiyerindeki hücrelerin kültürleri için büyüme ve adhezyon faktörlerinin, hormonların, lipidlerin, ve minerallerin kaynağı olarak oldukça önemlidir. Buna ilaveten serum hücre membranının geçirgenliğini düzenler ve hücredeki lipidler, enzimler, mikrobeyinler ve iz elementler için taşıyıcı olarak hizmet eder. Bununla birlikte, besiyerinde serum kullanımının maliyet, standardizasyon problemleri, spesifiklik, çeşitlilik ve bazı hücre kültürlerinde hücresel/büyüme fonksiyonlarının inhibisyonu veya uyarılması gibi istenmeyen etkileri içeren bazı dezavantajları da vardır.

pH: Normal memeli hücrelerinin çoğunun düzgün büyümesi için en uygun pH=7,4 olsa da hücre dizilerinde küçük değişiklikler olabilmektedir. Bazı trasforme hücre hatları daha asidik çevrelerde daha iyi büyüme gösterirken (pH=7-7,4), bazı normal fibroblast hücre hatları daha bazik çevreleri tercih eder(pH=7,4-7,7).

Karbondioksit (CO₂): pH'daki değişikliklere karşı kültürdeki hücrelerin büyüme besiyerinin ve tamponun pH'sını kontrol eder. Genellikle, tampon olarak HEPES veya karbondioksit/bikarbonat (CO₂/HCO₃⁻) bazlı bir tampon kullanılır. Çünkü besiyerinin

pH'sı çözünen CO₂'in ve HCO₃⁻'in hassas dengesine bağlıdır. Çünkü atmosferik CO₂'deki değişiklikler medyumun pH'sını değiştirebilir. Bu yüzden, özellikle transforme hücre hatları yüksek konsantrasyonlarda kültürleniyorsa kullanılan besiyeri HCO₃⁻ bazlı ise tamponlamak amacıyla eksojen CO₂ kullanmak gerekmektedir. Çoğu hücre kültürü yönteminde CO₂ havada %5-7 oranında kullanılmaktadır. CO₂/HCO₃⁻ konsantrasyonu doğru pH'a ve ozmolaliteye ulaşmada etkili olmaktadır.

Sıcaklık: Hücre kültürü için uygun sıcaklık genelde hücrelerin izole edildiği konağın vücut sıcaklığına bağlıdır ve sıcaklıktaki farklılık anatomik olarak daha az bir dereceye kadar olabilir (örn. cilt sıcaklığı iskelet kaslarındaki sıcaklıktan daha düşüktür). Fazla sıcaklık az sıcaklığa göre hücre kültürü için daha ciddi bir problem olabilmektedir. Çoğu insan ve hayvan hücre hattı için uygun sıcaklık 36-37°C aralığındadır. (Ryan, 2008; ThermoFisher Scientific, 2014).

2.3. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite, hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz bozukluğu olarak tanımlanabilir. Sitotoksosite testleri, test maddesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmaktadır (ISO 7405, ISO 10993).

Sitotoksosite testleri ile genellikle maddelerin; hücre sayısı veya büyümesi, hücre membran bütünlüğü, biyosentez veya enzim aktivitesi ve hücre genetik materyali üzerindeki etkileri ölçülür.

Bir materyalin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan testler; tekrarlanabilir olmalı, test edilen konsantrasyonları için doz-cevap eğrisini vermeli, hücre sayısı ve test cevabı arasında doğrusal ilişki olmalı ve test sonucunda elde edilen veriler *in vivo* koşullara yorumlanabilmelidir (Schmalz 1997).

In vitro sitotoksosite testlerinin avantajları:

- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon değerlendirilir.
- Çok sayıda örnek kısa zamanda ve ekonomik olarak incelenebilir.
- Kantitatif sonuçlara ulaşılabilir.
- Test yöntemleri standardize edilebilir.

In vitro sitotoksosite testlerinin dezavantajları:

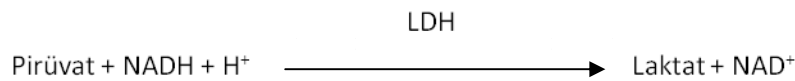
- Her test için bir tür hücre kullanılması,
- Kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması,
- Kültür ortamında doku koruyucu mekanizmalarının olmamasıdır (Schmalz 1997).

Sitotoksosite çalışmaları için genellikle hücre metabolizmasında oluşan değişikliklerin tespit edildiği testler kullanılır. Metabolizma testlerinde 96-kuyucuklu mikropalakalara yerleştirilmiş hücrelerin canlılıkları mikropalaka okuyuculu spektrofotometre yardımıyla tespit edilir. Bu yöntemler çok sayıda örneğin incelenmesine olanak veren, hızlı, besiyeri ortamı ve kullanılan plastik malzeme miktarını azalttığı için ucuz olan ve genellikle tayinleri kolorimetrik olarak yapılan yöntemlerdir.

In vitro hücre topluluğunda, %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon (inhibisyon konsantrasyonu, IC₅₀) olarak ifade edilir ve sitotoksitenin gösterilme biçimidir.

2.3.1. Laktat Dehidrojenaz Tayini (LDH Testi)

LDH, tüm hücrelerde var olan stabil bir sitoplazmik enzimdir ve hücre lizisi veya membran hasarı oluştuğunda hızlıca hücre kültürü süpernatantına salınır. Bir test materyeli ile inkübasyon sonrası, plazma membranındaki değişimleri belirleyen hızlı ve basit bir testtir. LDH, nikotinamid adenine dinükleotidin (NADH) NAD⁺'ye oksidasyonu ile piruvatı laktata indirger (Formül 2-1). NADH'ın 340 nm'deki absorbansı spektrofotometrede ölçülür. NADH tüketimine bağlı olarak absorbansta meydana gelen düşüş hücre hasarı ile orantılıdır. LDH testinde pozitif kontrol olarak genelde Triton X-100 kullanılmakta olup oluşan hasar pozitif kontrol ile inkübe edilmiş hücrelerdeki hasarın %100 olduğu kabul edilerek test maddesinin sitotoksitesi belirlenir. LDH testi ile maddenin IC₅₀, membran bütünlüğü ve hücre canlılığı üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür (Korzeniewski ve Callewaert, 1983).



Formül 2-1

2.3.2. MTT Testi

Test, canlı hücrelerde MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır. Soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluştururken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler mavi-mor renkli formazan ürününü oluşturmaz. Oluşan mavi-mor renkli kristaller isopropil alkol veya dimetilsülfoksit ile çözündürülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo ve ark., 2011).

2.3.3. XTT Testi

Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid), MTT testinde olduğu gibi metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat tetrazolyum redüktaz enzim sistemi aracılığıyla suda çözünebilir turuncu renkli bir formazan boyaya dönüşür ve elde edilen sonuçlar 450-490 nm'de spektrofotometrede ölçülür. Böylece, hücre canlılığındaki değişim formazan miktarında da değişime neden olur ve spektrofotometrik olarak elde edilen değer, %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitoksisitesi belirlenir. MTT testindeki gibi çözündürme aşamasını içermeyen bu test günümüzde hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesinde ve sitotoksisite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve Williams 2001; Wataha 2001). XTT testi ile maddenin IC₅₀, metabolik toksisite ve solunum zinciri üzerine etkisi hakkında bilgi edinmek mümkündür (ISO-10935).

2.3.4. Nötral kırmızı alım (NRU) testi

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitelerinin inhibisyonu ile ölçülür. Nötral kırmızı zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH

< sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutmazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçülür. Ölçülen değer %100 canlılığı gösteren değer ile kıyaslanarak test maddesinin sitotoksitesi belirlenir (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Absolu alkol	Sigma-Aldrich 32221
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik A2424
Eagle'ın minimum esansiyel besiyeri (EMEM)	Wisent 320026CL
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E5134
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
Tripan mavisi	Fluka 93595
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Biomatik A3338
Nötral kırmızı	Sigma-Aldrich N7005
Glasiyel Asetik asit	Riedel-de Haen 27225
Asetamiprid	Fluka 33674
Thiakloprid	Fluka 37905
Tiyametoksam	Fluka 37924
Klotianidin	Fluka 33589
İmidakloprid	Fluka 37894

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı pipetler (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (30-300 µL)	Eppendorf

Buzdolabı (+4°C)	Arçelik 5231 NFY
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo-Scientific Heracell 150i
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2041 D
Derin dondurucu (-80 °C)	Wisecry-Daihan-Scientific
Elektronik hassas terazi	Precisa XB 220 A
Etüv	Nüve
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus CKX4
Hassas terazi	Mettler H20
Laminar kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek-Epoch
Mini orbital çalkalayıcı	Stuart SSMI
Otomatik pipetör	Eppendorf
Otomatik Hücre Sayımı Cihazı	Luna Automated Cell Counter (Logos model: L10001)
Otoklav	Hirayama HV-50L
pH metre	Hanna HI 1131 B
Bidistile su cihazı	Millipore Gradient
Santrifüj	Rotofix II
Sıvı azot tankı	Cryopal
Su banyosu	Memmert WB14
Spin santrifüj	Labnet C1301B
Vorteks	Ika NC 28405

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

DNA saklama kutusu	Greiner bio-one
Enjektör (10 mL; 50 mL)	Set inject
Enjektör ucu steril filtre (0,22 µm naylon)	Minisart-Sartorius
Falkon tüp (15 mL; 50 mL)	Citotest
Falkon tüpler için uygun portüp	Greiner bio-one

Filtre kağıdı (110 mm)	Schleicher&Schvell
Hücre kültürü flaskı (25 cm ² ; 75 cm ²)	Nest
Kryo vial (2 mL)	Greiner bio-one
Lateks eldiven	Broche
Mikroplaka (6; 24; 96 kuyucuklu)	Nest
Mikrotüp (0,5 mL; 1,5 mL)	Greiner bio-one
Mikrotüpler için uygun portüp	Greiner bio-one
Nitril eldiven	Broche
Otoklav Bandı	Sussex
Otoklavlanabilir schott şişe (250 mL; 500 mL; 1 L)	Isolab
Pastör Pipeti (2 mL)	Greiner bio-one
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Nest
Ultra-0,5 Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner bio-one

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.4.1. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Cam malzemeler musluk altında 7-8 defa bol su ile çalkalandılar ve sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren distile su dolu kovada 1 gece bekletildiler. Ertesi gün tekrar musluk altında 7-8 defa yıkanarak çamaşır suyunun malzemelerden tamamen uzaklaştırılması sağlandı ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildi. 40°C'lik etüvde kurutulan cam malzemeler, 165°C'de 2 saat süre ile kuru-sıcak hava sterilizasyonuna tabi tutuldular. Isıya dayanıklı pipet uçları, mikrotüpler, schott şişelerin kapakları gibi plastik malzemelerin ve hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu otoklavda 121°C'de 3 atm basınçta 15 dk.'da gerçekleştirildi. Besiyeri ve serum gibi ısıya dayanıksız çözeltiler ise 0,22 µm'lik steril filtrelerden geçirilerek steril edildi.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışma alanları ve laminar kabinin içi %70'lik alkol ile düzenli olarak temizlendi. Çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı ve laminar kabinin UV lambaları açılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı. Hücre kültürü laboratuvarında çalışırken tek kullanımlık galoş ve eldiven

kullanıldı, laboratuvar önlüklerinin ise başka çalışmalarda kullanılmamasına özen gösterildi.

3.4.2. Hücre Dizilerinin Temini

İnsan hepatoselüler karsinoma (HepG2) ve insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y) Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyovialler içerisinde -196°C’de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

3.4.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Tripsin/EDTA çözeltisi (%0,2 / %0,04): 0,2 g tripsin ve 0,04 g EDTA tartılarak 100 mL bidistile suda çözündürüldü. 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi. Porsiyonlanarak -20°C’de saklandı.

Fetal sığır serumu (FBS): Hazır inaktive edilmiş FBS kullanıldı. Ancak, FBS inaktive edilmemiş ise; 56°C’ de 30 dk. inkübe edilerek inaktive edildi. Porsiyonlanarak -20°C’de saklandı. Çalışma günü 37°C’de çözündürülerek kullanıldı. FBS, besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek steril edildi.

Antibiyotik çözeltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10]: 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözeltisinden alınır, 10 mL’ye CMF-PBS ile tamamlanır.

Hücre dondurma çözeltisi: 10 mL DMSO, 10 mL FBS ve 1 mL %10’lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL’ye tamamlanarak hazırlandı.

HepG2 hücresi için besiyeri: DMEM/F12 besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 1 mL %10’lik antibiyotik çözeltisi, eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

SH-SY5Y hücresi için besiyeri: DMEM/F12:EMEM (1:1) besiyerine 10 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 1 mL %10’lik antibiyotik çözeltisi eklenerek 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce besiyeri 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde 15 dk. inkübe edilerek pH ve sıcaklık ayarlaması yapıldı. Taze olarak hazırlandı.

3.4.4. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Alınması

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C'lik su banyosunda 1-2 dk. çözülene kadar bekletildi. Vial kapağının su ile temas etmemesi için dikkat edildi. Vial %70'lik alkol ile silindi ve laminar kabin içine alındı. Hücreler, %10 FBS içeren besiyeri bulunan 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı, besiyerinde süspande edildi ve 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, hücre pelleti besiyerinde tekrar süspande edildi ve DMSO'nun toksik etkisinden kurtulmak amacıyla işlem tekrar edildi. Daha sonra, hücre pelletine 1 mL besiyeri eklendi, yavaşça pipetleme yapılarak hücreler süspande edildi ve 7-10 mL besiyeri içeren 25 cm²'lik ya da 75 cm²'lik flasklara ekildi. Flasklar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldılar.

3.4.5. Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücre kültür flasklarının tüm yüzeyini kaplamış halde bulunan yoğunlaşmış hücreler için 'konfluent durumda' ifadesi kullanılır. Hücreler konfluent duruma geldiğinde pasajlandılar. Pasajlama için flask inkübatörden alındı, laminar kabinde flask içerisindeki besiyeri döküldü. Hücrelerin yüzeyi 2 mL CMF-PBS çözeltisi ile yıkandı. Bu adım, tripsin aktivitesini azaltacak serum protein kalıntılarını uzaklaştırmak amaçlı yapılır. Yıkama işleminden sonra CMF-PBS döküldü ve 2 mL tripsin/EDTA çözeltisi ilave edildi, flask 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 dk. bekletildi. Tripsin ile hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin tripsin içinde gereğinden fazla beklememesi için mikroskop ile yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmelidir. Tripsin aktivasyonunu durdurmak amacıyla flaska 2-3 mL serumlu besiyeri eklendi, pipetleme yapıldı ve hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pellet 2 mL besiyeri ile süspande edildi. Hücreler hemasitometrede sayılarak, yaklaşık 10⁵ hücre/mL olacak şekilde içerisinde besiyeri bulunan flasklara ekildi. Flasklar, %90 bağıl nem, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildiler. Hücre dizisinin devamlılığının sağlanması için pasajlama işlemi ortalama haftada 2-3 kez yapıldı.

3.4.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklar ile dondurularak saklandılar. Bölüm 3.4.5.'de elde edilen hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre dondurma çözeltisi eklendi ve pastör pipeti ile pipetleme yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo

viallere aktarıldı, sırasıyla -20°C'de 30 dk., -80°C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.7. Hücrelerin Sayılması

Hücrelerin sayımı tripan mavisi testi ile yapıldı. Test, canlı hücrelerin tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, ölü hücrelerin bozulmuş hücre membranlarından boyayı hücre içerisine alabilmeleri esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenirken, ölü hücreler tamamıyla mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Hücre sayımı otomatik hücre sayım cihazı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, kontrol etme amacıyla hücre sayımı thoma lamı (hemositometre) adı verilen 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4x16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak da ışık mikroskobunda gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı (Formül 3-1):

$$\text{Toplam hücre sayısı/mL} = \text{Sayım sonucu} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4 \times \text{Besiyeri miktarı (mL)}$$

Formül 3-1

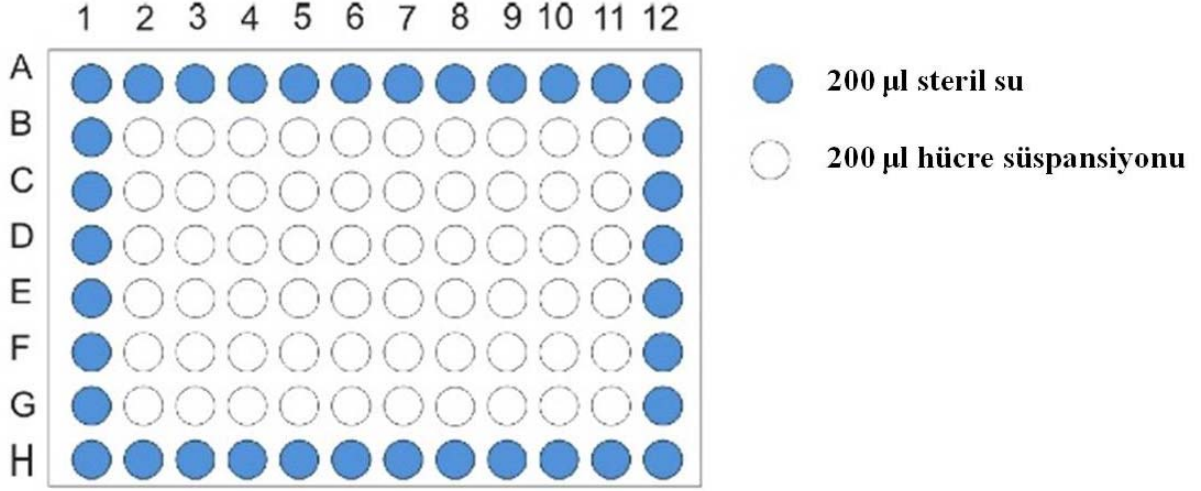
3.4.8. 96 Kuyucuklu Mikroplakalarda Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültürlerinin mikroplakalara uygulanması esnasında kuyucuklarda düzensiz hücre yoğunluğu gerçekleşebilir. Hücre süspansiyonunun homojen olduğundan emin olunmalı ve hücre topaklarının oluşumu engellenmelidir. Aynı zamanda, testin uygun hassasiyette olması için test esnasında hücrelerin yakın bitişiklikte olması gerekir. Hücrelerin kuyucuklar arasında düzenli ve eşit dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları mikroskopta incelenmelidir. Hücre kültürleri aşağıda belirtildiği şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalarda hazırlandı:

1. Bir rezervuar içerisine steril bidistile su konuldu ve inkübasyon sırasında kültür besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 96 kuyucuklu mikroplakanın A ve H sıraları ile 1. ve 12. sütunlarındaki her bir kuyucuğuna 100 µL su dağıtıldı (Şekil 3-1).

2. Her bir kuyucukta 10⁴ hücre 100 µL besiyeri içinde olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalara hücreler dağıtıldı: 6,5 x 10⁵ hücre 6,5 mL besiyerinde süspande edildi ve steril rezervuar içerisine hücre süspansiyonu konuldu. 96 kuyucuklu mikroplakalara Şekil 3.1'de gösterildiği şekilde 100 µL hücre süspansiyonu dağıtıldı.

3. 96 kuyucuklu mikrolakadaki hücre süspansiyonu 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi.



Şekil 3-1: 96 kuyucuklu mikrolakaya hücre ekimi.

3.4.9. Test Maddelerinin, Negatif ve Pozitif Kontrol Çözeltilerinin Hazırlanması

Asetamiprid: 400 mM konsantrasyonda olacak şekilde 22,27 mg madde 0,25 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

İmidakloprid: 400 mM konsantrasyonda olacak şekilde 25,57mg madde 0,25 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

Klotianidin: 400 mM konsantrasyonda olacak şekilde 24,97 mg madde 0,25 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

Thiakloprid: 400 mM konsantrasyonda olacak şekilde 25,27 mg madde 0,25 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

Thiometoksam: 200 mM konsantrasyonda olacak şekilde 29,171 mg madde 0,5 mL DMSO'da çözülerek stok çözelti hazırlandı.

%10'luk DMSO çözeltisinin hazırlanışı: 10 mL DMSO besiyeri ile 100 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1 olması sağlandı.

%1'lik SDS ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 0,1 g SDS, PBS ile 10 mL'ye tamamlandı.

%0,1'lik SDS çalışma çözeltisinin hazırlanışı: %1'lik SDS ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı. Maruziyet plakalarına uygulama sırasında 1/10 oranında seyreltilerek hücrelere 0,1 mg/mL konsantrasyonunda SDS (~IC₅₀) pozitif kontrol olarak uygulandı (ISO-10993-5) ve çözelti içindeki PBS konsantrasyonunun da %1 olması sağlandı.

Test maddelerinin çözündürüldüğü DMSO'nun hücrelere maruziyet sırasında konsantrasyonunun %1'i geçmemesi gerektiğinden dolayı test maddeleri 100 katı konsantrasyonda stok çözeltisi halinde DMSO içerisinde hazırlandı. Daha sonra test madde çözeltilerinin farklı konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

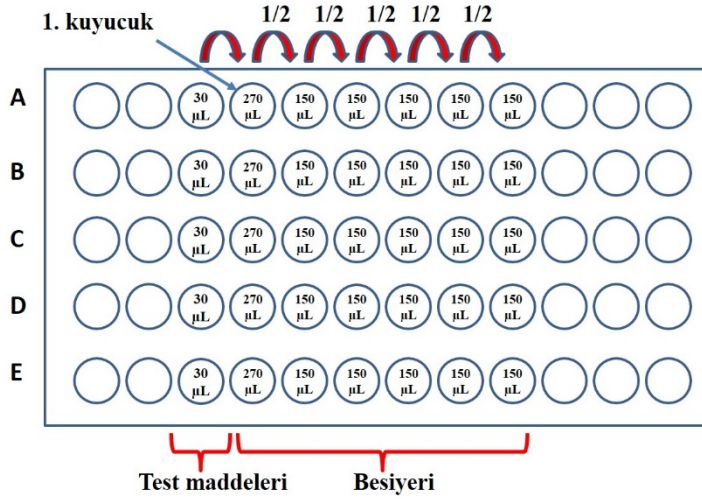
Test maddelerinin seyreltilmesi

Stok test maddeleri 96 kuyucuklu mikropalakada 1/10 oranında besiyeri ile seyreltildi. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden 1/2 oranında seyreltme yapılarak toplam 6 konsantrasyonda standard çözeltileri hazırlandı. Seyreltme işlemi için uygulanan plaka düzeni Şekil 3-2'de gösterildi:

1. A - E sırasındaki 1. kuyucuğa 270 µL besiyeri 2.-6. kuyucuklara 150 µL besiyeri konuldu.

2. A - E sırasındaki 1. kuyucuğa maddelerin DMSO içinde hazırlanan çözeltisinden 30 µL konuldu ve iyice karıştırıldı.

3. 1. kuyucuktan 150 µL alınarak 2. kuyucuğa aktarıldı (1/2 oranında seyreltme), iyice karıştırıldı ve bu kuyucuktan 150 µL alınarak 3. kuyucuğa aktarıldı. Bu işlem 5. kuyucuk da dahil olmak üzere yapıldı. En son 6. kuyucuktaki fazla olan 150 µL atıldı. Bu şekilde toplam 6 konsantrasyonda olmak üzere madde seyreltmeleri hazırlanmış oldu.



Şekil 3-2: Test maddelerinin 1/2 oranında seyreltilmesi.

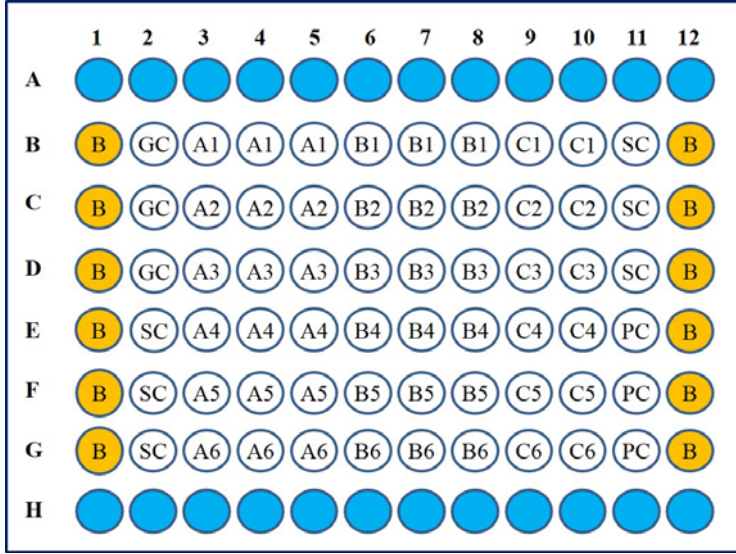
3.4.10. Hücre Kültürünün Test Maddelerine Maruz Bırakılması

1. Bölüm 3.4.8’de belirtilen 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücre kültür mikropkaskındaki kuyucuklardan (A ve H sırası hariç) 8 kanallı pipet kullanılarak kültür besiyeri uzaklaştırıldı.

2. Bu kuyucuklara 50 µL PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (kuyucuk yüzeyine tutunmuş olan hücrelerin kazınmamasına, zarar görmemesine dikkat edilmelidir).

3. Vakit kaybetmeden her bir kuyucuğa 90 µL taze hücre kültürü besiyeri eklendi (hücre katmanının kurumasından dolayı oluşabilecek hücre ölümü veya stresini engellemek için hızlı yapılmalıdır).

4. Maruziyet mikropkaskası Şekil 3.3’te gösterildiği şekilde düzenlendi:



- A + H sıraları: Steril bidistile su
 B: Kültür besiyeri + hücre yok (blank, negatif kontrol)
 GC: Kültür besiyeri + hücre (hücre büyüme kontrolü)
 SC: Kültür besiyeri + hücre + DMSO (%1) (çözücü kontrolü)
 PC: Kültür besiyeri + hücre + SDS (0,1 mg/mL) (pozitif kontrol)
 A1, A2, A6: Kültür besiyeri + hücre + A bileşiminin 6 farklı konsantrasyonu
 B1, B2, B6: Kültür besiyeri + hücre + B bileşiminin 6 farklı konsantrasyonu
 C1, C2, C6: Kültür besiyeri + hücre + C bileşiminin 6 farklı konsantrasyonu

Şekil 3-3: 96 kuyucuklu maruziyet mikroplaka düzeni.

5. 1 ve 12. Sütunların B-G kuyucuklarına 100 µL besiyeri konuldu (blank, negatif kontrol).

6. B2, C2 ve D2 kuyucuklarına 10 µL hücre kültürü besiyeri konuldu (hücre büyümesi kontrolü, GC).

7. E2, F2, G2, B11, C11 ve D11 kuyucuklarına 10 µL %10'luk DMSO çözeltisi konuldu (çözücü kontrolü, SC).

8. E11, F11 ve G11 kuyucuklarına 10 µL %0,1'lik SDS çözeltisi konuldu (pozitif kontrol, PC).

9. A1-A6, B1-B6, C1-C6 şeklinde işaretlenmiş kuyucuklara Bölüm 3.4.9'da belirtildiği üzere seyreltmeleri yapılmış test maddelerinden 10'ar µL tatbik edildi (6 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrar yapıldı). 5 test maddesi için 4'er mikrolaka 24 ve 48 saatlik maruziyetler için hazırlandı. Aynı düzende 2. farklı bir günde çalışılmak üzere toplam her konsantrasyon için 6 tekrar yapıldı.

10. 96 kuyucuklu mikrolakalar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 veya 48 saat inkübe edildi.

11. MTT testi ve nötral kırmızı testleri için yukarıda belirtildiği şekilde ayrı maruziyet plakaları oluşturuldu.

3.5. Sitotoksite Testleri

Test maddelerine maruz bırakılan hücrelerin canlılığının tespiti MTT ve NRU testi uygulanarak gerçekleştirildi.

3.5.1. MTT Testi

3.5.1.1. MTT Testinin Esası

MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının hücredeki (canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış) mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır (Mosmann, 1983; Alley ve ark., 1988). Canlı hücrede soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavimor renkli çözünmeyen formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Hücreler organik çözücü (örn. isopropanol, DMSO) ile çözündürüldükten sonra formazan çözeltisine ait rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de ölçülür. MTT'nin redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde meydana gelir ve bu aktivitenin seviyesi hücrelerin canlılıklarıyla ölçülür (Alley ve ark., 1988; Fotakis ve Timbrell, 2006; Mosmann, 1983; Van Meerloo ve ark., 2011).

3.5.1.2. MTT Testi Protokolü

MTT çözeltisinin hazırlanışı: 5 mg MTT, 1 mL 1 x CMF-PBS içinde çözündürüldü. Çözelti +4°C'de karanlıkta saklandı.

Deneyin yapılışı

1. Bölüm 3.4.10'da anlatıldığı gibi test maddeleri ile inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropolanın her kuyucuğuna 20 µL MTT çözeltisi eklendi.

2. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

3. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat inkübe edildi.

4. Kuyucuklardaki üstteki sıvı atıldı ve kuyucuklara 100 µL DMSO ilave edildi.

5. 150 rpm'de inkübatör dışında 5 dk. orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 590 nm'de (670 nm referans dalga boyuna karşı) mikropkaya okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.2. Nötral kırmızı alım (NRU) testi

3.5.2.1. NRU Testinin Esası

Canlı hücreler lizozomlarında nötral kırmızı boyasını tutma kapasitesine sahiptirler. Böylece, hücre canlılığı nötral kırmızı boyasını tutma kapasitelerinin inhibisyonu ile ölçülür. Nötral kırmızı zayıf katyonik bir boya olduğundan kolaylıkla hücre mebranına penetre olur ve lizozomlarda intraselüler olarak birikir (lizozomal pH < sitoplazmik pH) ve oradaki anyonik bölgelerle lizozomal matrikse bağlanır. Hücre yüzeyinde ya da duyarlı lizozomal membrandaki değişiklikler nötral kırmızı boyasının alınmasını ve bağlanmasını azaltır. Böylelikle canlı hücreler boyayı tutarken, zarar görmüş ya da ölü hücreleri tutmazlar. Boyanın nüfuz ettiği hücrelerde oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçülür (Fotakis ve Timbrell, 2006; Repetto ve ark., 2008).

3.5.2.2. NRU Testi için Çözeltilerin Hazırlanışı

Nötral kırmızı ana stok çözeltisinin hazırlanışı: 100 mg nötral kırmızısı boyası 10 mL uygun besiyerinde çözüldü. Çözelti steril 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı. Boya kristallerinin iyi çözündürülmesi için çözelti çalışma gününden önce 37°C'de 1 gece inkübe edildi ve 0,22 µm naylon enjektör ucu filtreden geçirildi.

Nötral kırmızı çalışma çözeltisinin hazırlanışı: 100 µL nötral kırmızı ana stok çözeltisinden alınır, hücre kültürü besiyeri ile 10 mL'ye tamamlanır.

Nötral kırmızı çözündürme çözeltisinin hazırlanışı: 150 µL glasiyel asetik asit, 7,35 mL distile su ve 7,5 mL absolu alkol karıştırılarak hazırlanır. Kullanmadan hemen önce hazırlanmalı ve 1 saat içerisinde kullanılmalıdır.

3.5.2.3. NRU Testi Protokolü

1. Bölüm 3.4.10'da anlatıldığı gibi inkübe edilen hücre kültürünü içeren 96 kuyucuklu mikropkakanın kuyucuklarındaki besiyeri atıldı ve kuyucuklar 150 µL PBS ile yıkandı.

2. Her kuyucuğa 100 µL nötral kırmızı çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

3. Mikroplakanın kuyucuklarındaki boya çözeltisi atıldı ve 150 µL PBS ile dikkatlice yıkandı (nötral kırmızı çalışma çözeltisinden kaynaklanabilecek boya kristallerinin kalmamasına dikkat edildi).

4. Her kuyucuğa 150 µL nötral kırmızı çözündürme çözeltisi eklendi.

5. 150 rpm'de 10 dk. inkübatör dışında orbital çalkalayıcıda bekletildi.

6. Oluşan rengin şiddeti 540 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

3.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

1. Çözücü kontrol grubundan (SC) elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder. Örneklerde canlı hücre oranı, çözücü kontrol grubunun (SC) absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplandı.

2. Çözücü kontrollerinin (SC) 96 kuyucuklu mikroplakanın sağ ve sol kenarında bulunması sistematik hataların belirlenmesini sağlar. Testin anlamlı olabilmesi için, sağ ve sol taraftaki çözücü kontrollerin ortalamaları ile tüm çözücü kontrollerin ortalamaları arasında %15'ten fazla fark olmaması gerekir.

3. Hücre büyüme kontrolleri (GC) çözücünün etkisini belirlemeyi sağlar. Eğer çözücü kontrollerin değerleri hücre büyüme kontrolleri ile belirgin bir fark gösterirse, test bileşiklerinin inhibisyon değerleri dikkatle yorumlanmalı, mümkünse farklı bir çözücü seçilmelidir.

4. Testin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla her maruziyet mikroplakasına SDS çözeltisi (son konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde) eklenerek pozitif kontrol grubu (PC) oluşturuldu. Çalışılan koşullarda, SDS çözeltisine (0,1 mg/mL) ait hücre ölümünün yaklaşık %50 olması gerekir (ISO-10993-5).

5. Her çözücü kontrol (SC) ve örnek absorbans değerlerinden, blank (B) değerlerine ait ortalama absorbans değeri çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi.

6. Düzeltilmiş çözücü kontrol (düzeltilmiş OD_{SC}) ve örnek (düzeltilmiş OD_{Örnek}) absorbans değerlerinin ortalaması alındı.

7. % Relatif inhibisyon (% hücre ölümü) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Formül 3-2):

$$\% \text{ Relatif inhibisyon} = 100 - (\text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{Örnek}} \times 100 / \text{düzeltilmiş ort. OD}_{\text{SC}})$$

Formül 3-2

8. X ekseninde maruziyet konsantrasyonu, Y ekseninde % relatif inhibisyon (% hücre ölümü) olacak şekilde excel programı kullanılarak konsantrasyona karşı % inhibisyon (% hücre ölümü) eğrisi çizildi.

9. Eğriden %50 inhibisyona (hücre ölümüne) karşılık gelen konsantrasyon hesaplanarak çalışılan maddelerin IC₅₀ (%50 oranında hücre ölümüne sebep olan konsantrasyon) değeri belirlendi.

3.5.4. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler “ortalama ± standart sapma” olarak verildi. Veriler istatistiksel olarak “SPSS 21.0 for Windows” paket programı kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler için ‘Tek Yönlü Varyans’ (ANOVA) analizi ile çoklu karşılaştırma Dunnet testi kullanılarak yapıldı. p<0,001 ve p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

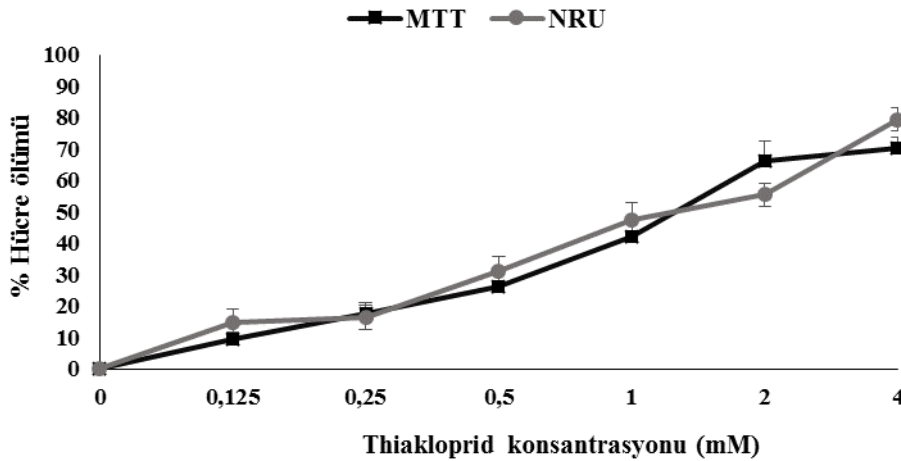
4. BULGULAR

Test maddelerinin SH-SY5Y ve HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi hücre canlılığının kantitatif ölçümüne dayanan MTT ve NRU testi ile gerçekleştirildi.

4.1. Test Maddelerinin SH-SY5Y Hücrelerinde Sitotoksitesi

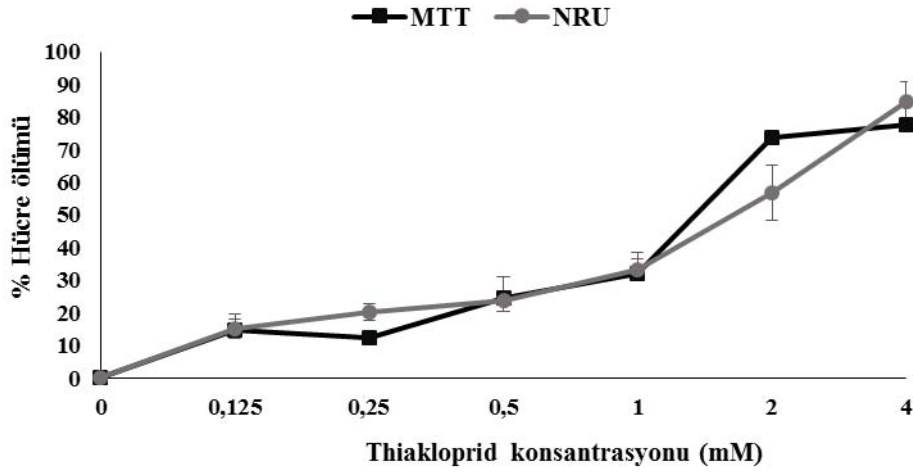
4.1.1. Thiakloprid

SH-SY5Y hücrelerine 24 saat thiakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-1'de gösterilmiştir. Thiaklopridin SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 1,28 ve 1,16 mM olarak belirlendi (Tablo 4-1).



Şekil 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat thiakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-2'de gösterilmiştir. Thiaklopridin SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 1,20 ve 1,93 mM olarak belirlendi (Tablo 4-1).



Şekil 4-2: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-1: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Thiakloprid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	9,44 ± 2,21	14,79 ± 4,37	14,64 ± 4,94	15,07 ± 3,01
0,25	17,43 ± 3,44*	16,30 ± 3,75*	12,43 ± 2,11	20,33 ± 2,52**
0,5	26,07 ± 5,20**	31,05 ± 4,50**	24,41 ± 6,52**	23,58 ± 3,26**
1	42,04 ± 3,80**	47,35 ± 5,60**	31,89 ± 6,47**	33,20 ± 3,48**
2	66,01 ± 6,56**	55,41 ± 3,74**	73,54 ± 1,73**	56,67 ± 8,46**
4	70,41 ± 3,35**	79,32 ± 3,64**	77,48 ± 1,89**	84,74 ± 6,15**
IC ₅₀	1,28	1,16	1,20	1,93

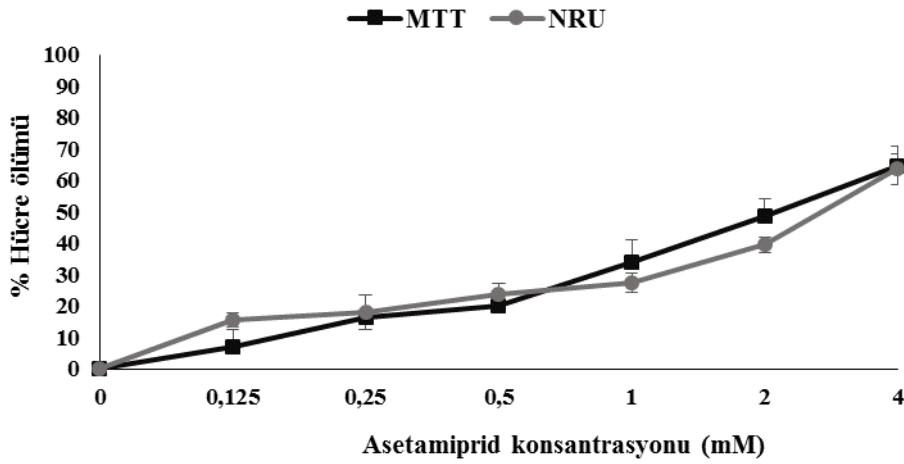
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

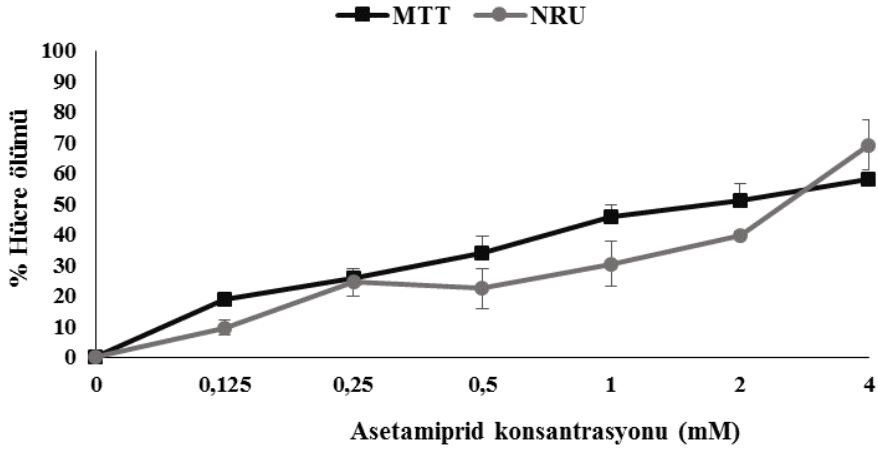
4.1.2. Asetamiprid

SH-SY5Y hücrelerine 24 saat asetamiprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-3'de gösterilmiştir. Asetamipridin SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 2,16 ve 3,09 mM olarak belirlendi (Tablo 4-2).



Şekil 4-3: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat asetamiprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-4'de gösterilmiştir. Asetamipridin SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 1,83 ve 2,35 mM olarak belirlendi (Tablo 4-2).



Şekil 4-4: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-2: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Asetamiprid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	6,98 ± 5,39	15,62 ± 2,29	18,64 ± 2,11*	9,60 ± 2,50
0,25	16,31 ± 2,04*	18,04 ± 5,46*	25,60 ± 2,25**	24,37 ± 4,52**
0,5	19,86 ± 3,61*	23,71 ± 3,54**	33,82 ± 5,39**	22,29 ± 6,53**
1	34,07 ± 7,14**	27,31 ± 2,98**	45,91 ± 3,72**	30,38 ± 7,24**
2	48,52 ± 5,54**	39,49 ± 2,36**	51,00 ± 5,62**	39,79 ± 1,15**
4	64,39 ± 6,48**	63,62 ± 4,94**	57,93 ± 0,76**	69,15 ± 8,29**
IC ₅₀	2,16	3,09	1,83	2,35

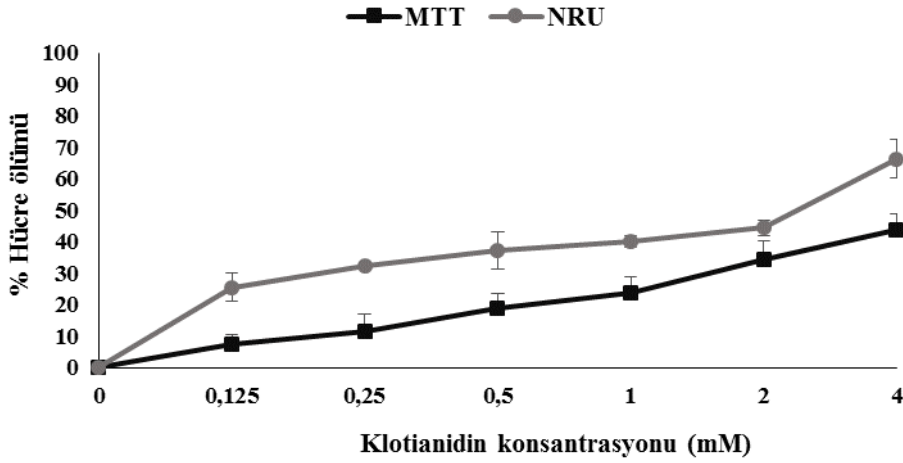
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

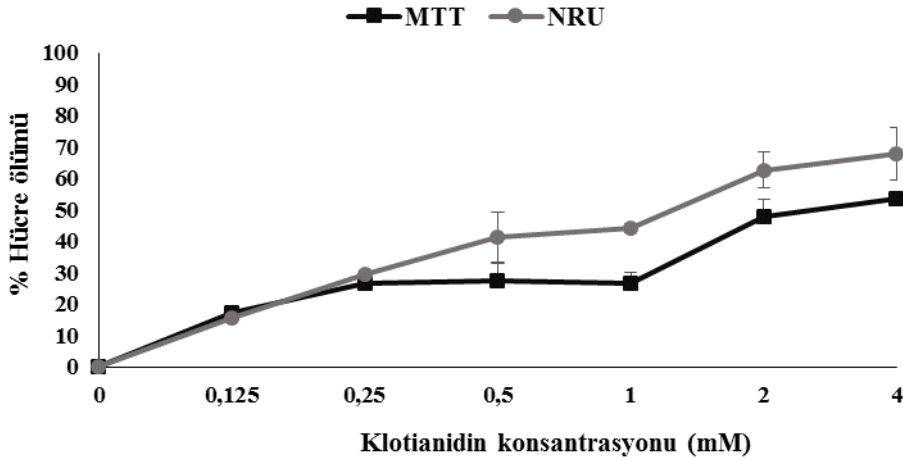
4.1.3. Klotianidin

SH-SY5Y hücrelerine 24 saat klotianidin maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-5'de gösterilmiştir. Klotianidin SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile >4 ve 2,29 mM olarak belirlendi (Tablo 4-3).



Şekil 4-5: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat klotianidin maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-6'de gösterilmiştir. Klotianidin'in SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 3,73 ve 1,09 mM olarak belirlendi (Tablo 4-3).



Şekil 4-6: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-3: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Klotianidin (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	7,17 ± 3,45	25,49 ± 4,49**	17,00 ± 2,11*	15,45 ± 0,55
0,25	11,39 ± 5,39	32,22 ± 0,21**	26,58 ± 2,25**	29,27 ± 0,49**
0,5	18,69 ± 4,60*	37,14 ± 5,91**	27,34 ± 5,39**	41,37 ± 7,91**
1	23,73 ± 5,26**	40,17 ± 1,82**	26,50 ± 3,72**	44,20 ± 1,35**
2	34,15 ± 5,88**	44,33 ± 2,32**	47,84 ± 5,62**	62,60 ± 5,65**
4	43,79 ± 5,04**	66,34 ± 5,96**	53,60 ± 0,76**	67,78 ± 8,52**
IC ₅₀	>4	2,29	3,73	1,09

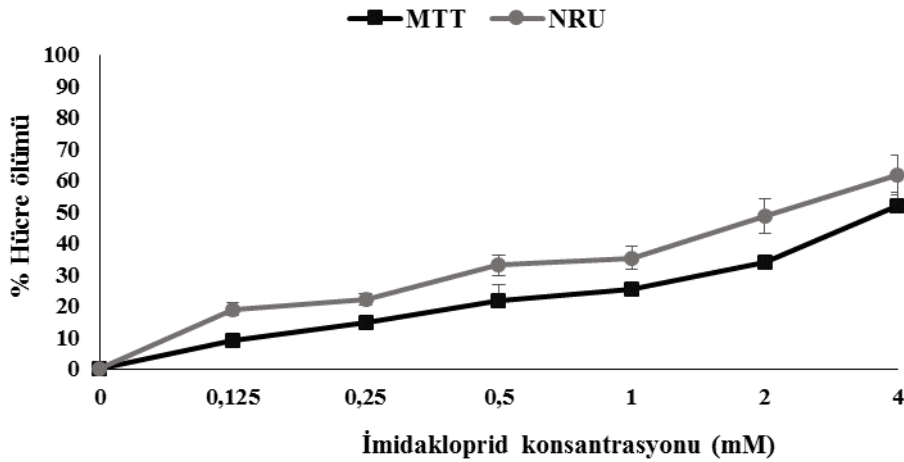
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

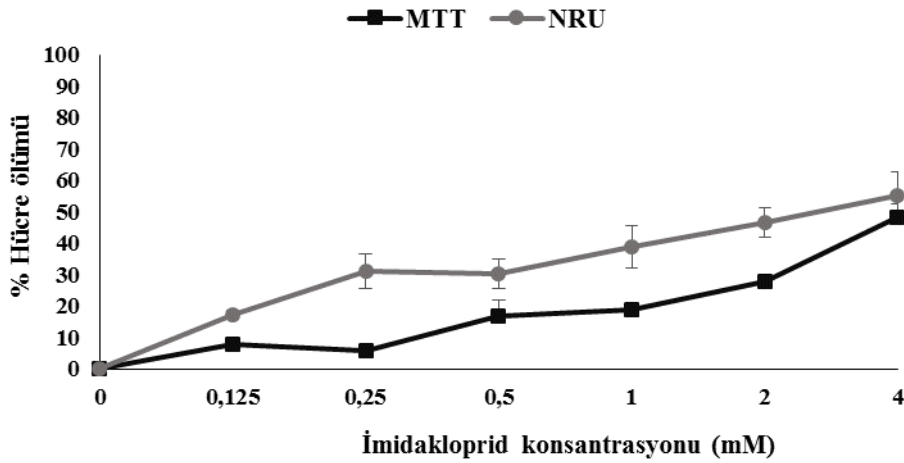
4.1.4. İmidakloprid

SH-SY5Y hücrelerine 24 saat imidakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-7'de gösterilmiştir. İmidaklopridin SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile 3,69 ve 2,13 mM olarak belirlendi (Tablo 4-4).



Şekil 4-7: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat imidakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-8'de gösterilmiştir. İmidaklopridin SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile >4 ve 2,97 mM olarak belirlendi (Tablo 4-4).



Şekil 4-8: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-4: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

İmidakloprid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	8,84 ± 2,54	18,84 ± 2,01*	7,76 ± 1,24	17,34 ± 1,41*
0,25	14,61 ± 3,72	21,94 ± 1,89**	5,70 ± 1,12	30,98 ± 5,42**
0,5	21,61 ± 3,72**	33,02 ± 3,26**	16,76 ± 4,98*	30,37 ± 4,75**
1	25,13 ± 5,54**	35,33 ± 3,48**	18,87 ± 2,29*	38,73 ± 6,75**
2	34,01 ± 5,70**	48,49 ± 5,46**	27,87 ± 1,59**	46,44 ± 4,63**
4	51,76 ± 3,77**	61,69 ± 6,15**	48,05 ± 4,55**	55,05 ± 7,51**
IC ₅₀	3,69	2,13	>4	2,97

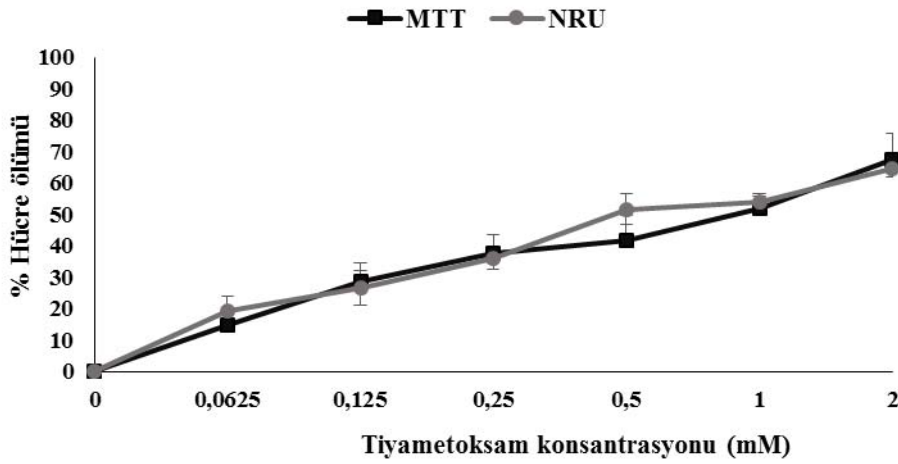
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

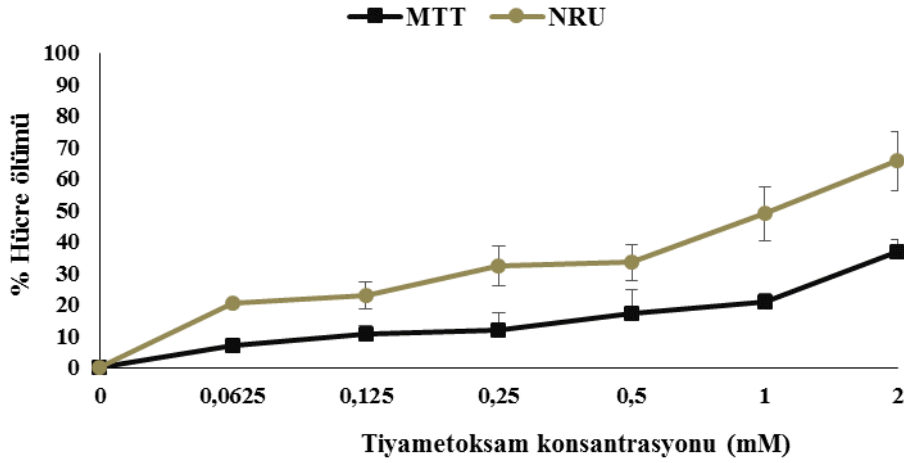
4.1.5. Tiyametoksam

SH-SY5Y hücrelerine 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-9'de gösterilmiştir. Tiyametoksamın SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile 1,08 ve 0,65 mM olarak belirlendi (Tablo 4-5).



Şekil 4-9: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

SH-SY5Y hücrelerine 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-10'de gösterilmiştir. Tiyametoksamın SH-SY5Y hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile >4 ve 1,22 mM olarak belirlendi (Tablo 4-5).



Şekil 4-10: SH-SY5Y hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-5: SH-SY5Y hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Tiyametoksam (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,063	14,94 ± 4,96	19,14 ± 4,98*	7,13 ± 1,26	20,54 ± 0,21**
0,125	28,68 ± 5,99**	26,70 ± 5,58**	10,76 ± 2,33	22,91 ± 4,41**
0,25	37,42 ± 6,18**	35,85 ± 3,54**	12,01 ± 5,39	32,22 ± 6,47**
0,5	41,78 ± 7,93**	51,66 ± 4,78**	17,10 ± 7,60*	33,41 ± 5,70**
1	51,91 ± 4,55**	53,93 ± 1,82**	20,92 ± 2,54**	48,90 ± 8,63**
2	67,28 ± 8,55**	64,37 ± 2,53**	36,89 ± 3,55**	65,61 ± 9,51**
IC ₅₀	1,08	0,65	>4	1,22

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

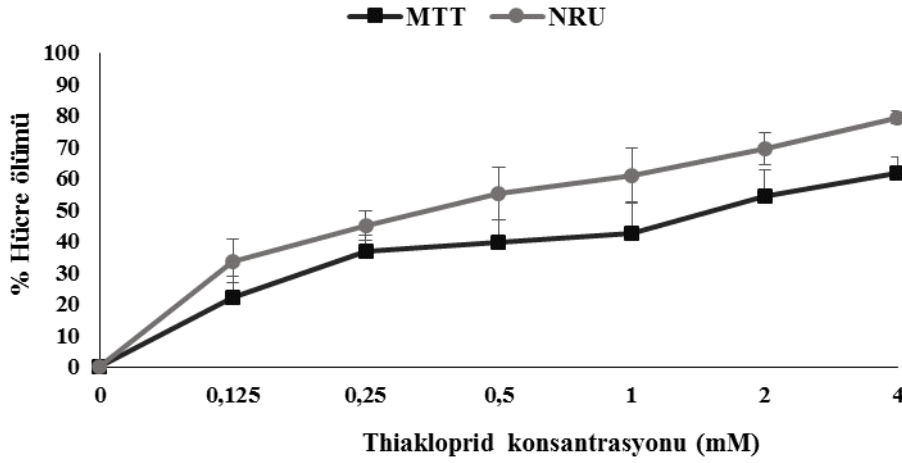
* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

4.2. Test Maddelerinin HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitesi

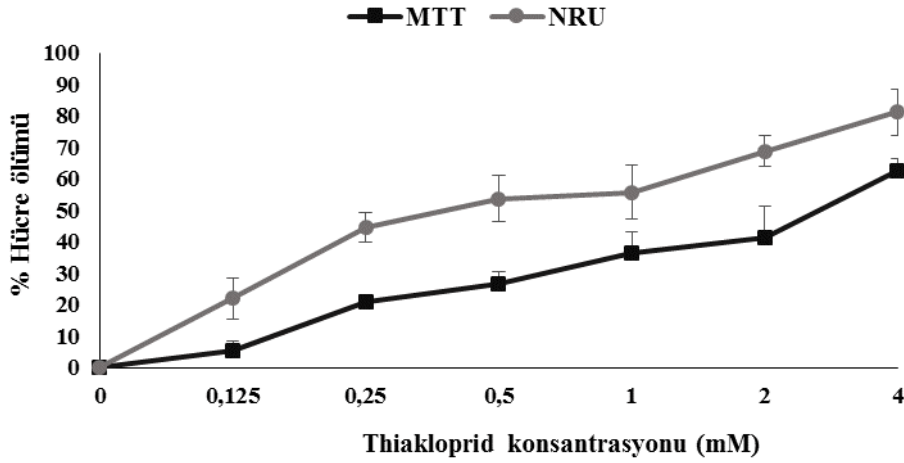
4.2.1. Thiakloprid

HepG2 hücrelerine 24 saat thiakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-11'de gösterilmiştir. Thiaklopridin HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 1,40 ve 0,40 mM olarak belirlendi (Tablo 4-6).



Şekil 4-11: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat thiakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

HepG2 hücrelerine 48 saat thiakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-12'de gösterilmiştir. Thiaklopridin HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 2,38 ve 0,53 mM olarak belirlendi (Tablo 4-6).



Şekil 4-12: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat thiaklopid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-6: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat thiaklopid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Thiaklopid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	22,25 ± 6,46**	33,52 ± 6,97**	5,15 ± 3,38	22,00 ± 6,50**
0,25	36,94 ± 4,98**	45,10 ± 4,68**	20,89 ± 2,34**	44,55 ± 4,77**
0,5	39,46 ± 7,47**	55,23 ± 8,29**	26,72 ± 3,51**	53,68 ± 7,52**
1	42,64 ± 9,44**	61,03 ± 8,72**	36,15 ± 6,74**	55,72 ± 8,41**
2	54,31 ± 8,52**	69,49 ± 9,09**	41,36 ± 9,95**	68,81 ± 4,87**
4	61,65 ± 5,28**	79,35 ± 2,09**	62,48 ± 3,80**	81,09 ± 7,17**
IC ₅₀	1,40	0,40	2,38	0,53

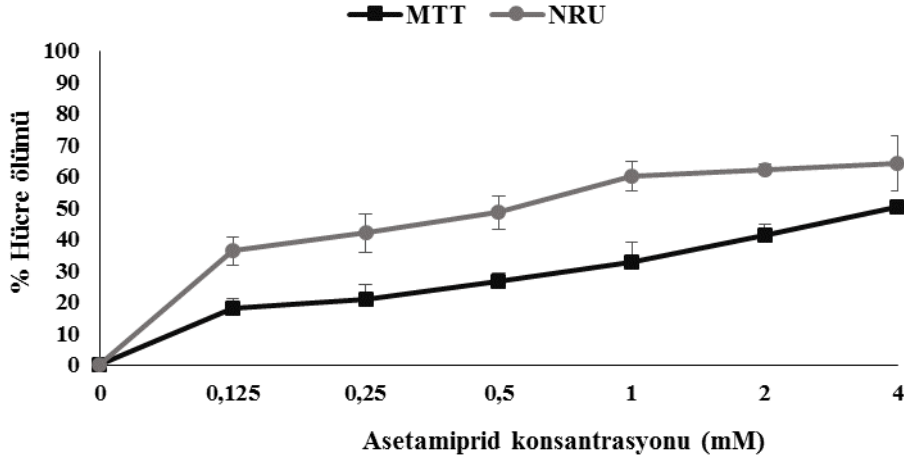
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

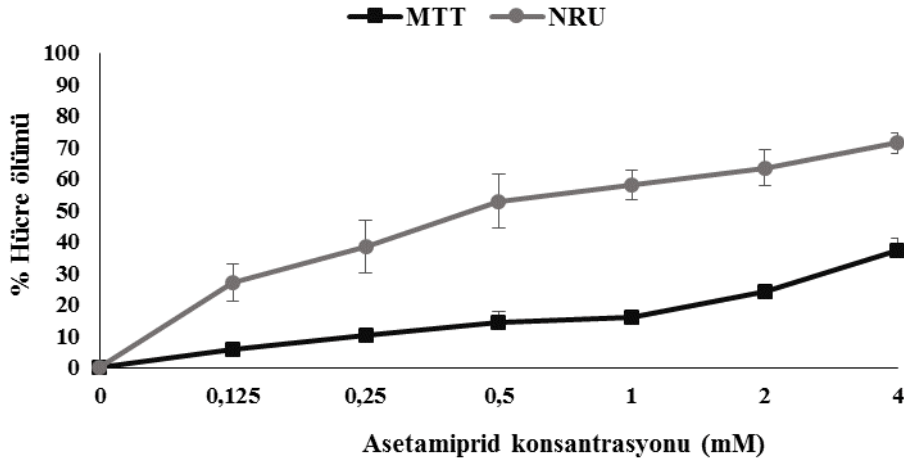
4.2.2. Asetamiprid

HepG2 hücrelerine 24 saat asetamiprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-13'de gösterilmiştir. Asetamipridin HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 3,61 ve 0,56 mM olarak belirlendi (Tablo 4-7).



Şekil 4-13: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

HepG2 hücrelerine 48 saat asetamiprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-14'de gösterilmiştir. Asetamipridin HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile >4 ve 0,61 mM olarak belirlendi (Tablo 4-7).



Şekil 4-14: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-7: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat asetamiprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Asetamiprid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	17,94 ± 2,98*	36,15 ± 4,50**	5,76 ± 0,35	26,96 ± 5,89**
0,25	21,01 ± 4,69**	41,91 ± 6,12**	10,36 ± 0,95	38,32 ± 8,46**
0,5	26,74 ± 2,48**	48,41 ± 5,27**	14,34 ± 3,58	52,76 ± 8,53**
1	32,82 ± 6,28**	59,93 ± 4,72**	16,12 ± 1,47*	57,97 ± 4,65**
2	41,20 ± 3,68**	62,13 ± 1,65**	23,96 ± 0,78**	63,42 ± 5,63**
4	50,25 ± 2,41**	64,09 ± 8,95**	37,19 ± 3,90**	71,32 ± 3,29**
IC ₅₀	3,61	0,56	>4	0,61

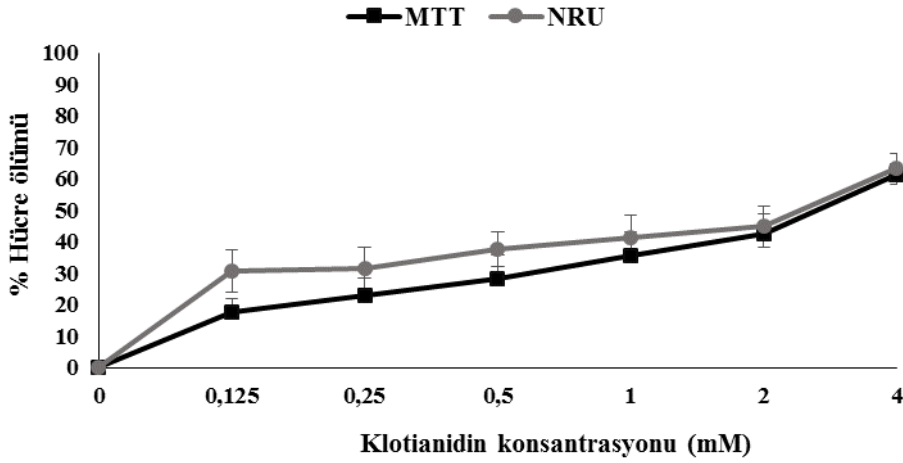
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

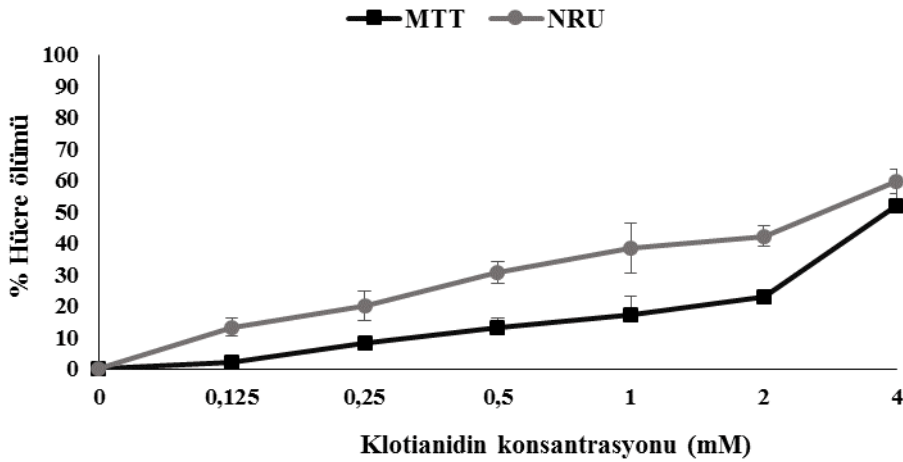
4.2.3. Klotianidin

HepG2 hücrelerine 24 saat klotianidin maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-15'de gösterilmiştir. Klotianidin'in HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile 2,78 ve 2,39 mM olarak belirlendi (Tablo 4-8).



Şekil 4-15: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

HepG2 hücrelerine 48 saat klotianidin maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-16'de gösterilmiştir. Klotianidin'in HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC_{50} değerleri sırası ile 3,95 ve 2,84 mM olarak belirlendi (Tablo 4-8).



Şekil 4-16: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-8: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat klotianidin maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Klotianidin (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	17,49 ± 4,49*	30,51 ± 6,65**	2,08 ± 0,45	13,24 ± 2,93
0,25	23,01 ± 5,21**	31,62 ± 6,46**	8,09 ± 0,99	19,98 ± 4,59*
0,5	28,31 ± 7,30**	37,50 ± 5,43**	13,24 ± 3,09	30,58 ± 3,55**
1	35,57 ± 7,72**	41,05 ± 7,17**	17,32 ± 5,95*	38,24 ± 7,97**
2	42,35 ± 6,35**	44,73 ± 6,59**	22,92 ± 2,08**	42,16 ± 3,29**
4	61,29 ± 3,51**	63,24 ± 4,90**	51,92 ± 7,77**	59,62 ± 4,07**
IC ₅₀	2,78	2,39	3,95	2,84

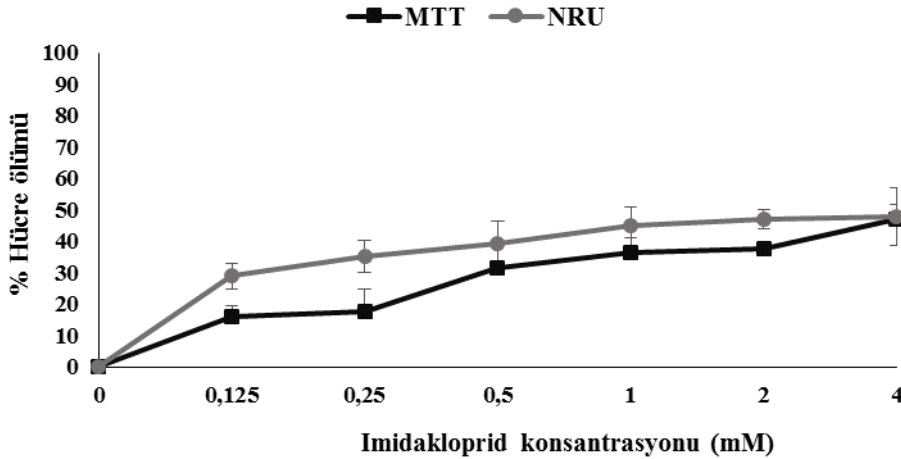
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

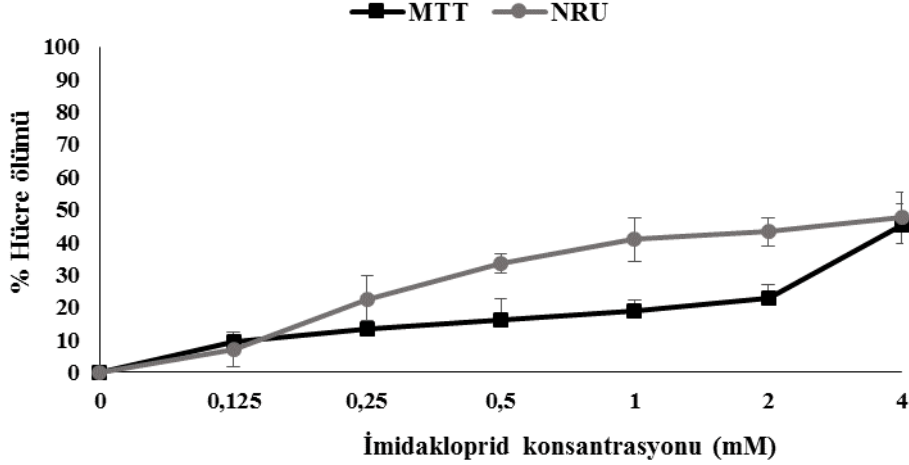
4.2.4. İmidakloprid

HepG2 hücrelerine 24 saat imidakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-17'de gösterilmiştir. İmidaklopridin HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile >4 ve >4 mM olarak belirlendi (Tablo 4-9).



Şekil 4-17: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

HepG2 hücrelerine 48 saat imidakloprid maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-18'de gösterilmiştir. İmidaklopridin HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile >4 ve >4 mM olarak belirlendi (Tablo 4-9).



Şekil 4-18: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-9: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat imidakloprid maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

İmidakloprid (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,125	16,10 ± 3,11*	28,81 ± 4,03**	9,31 ± 0,69	7,09 ± 5,34
0,25	17,76 ± 6,93*	35,02 ± 5,16**	13,24 ± 2,68	22,58 ± 7,05**
0,5	31,50 ± 0,90**	39,06 ± 7,14**	16,24 ± 6,50*	33,47 ± 2,78**
1	36,28 ± 4,95**	44,79 ± 6,05**	18,95 ± 3,12*	40,79 ± 6,79**
2	37,50 ± 2,03**	46,93 ± 3,15**	22,79 ± 4,23**	43,27 ± 4,31**
4	46,77 ± 4,99**	47,78 ± 9,21**	45,40 ± 6,33**	47,46 ± 7,72**
IC ₅₀	>4	>4	>4	>4

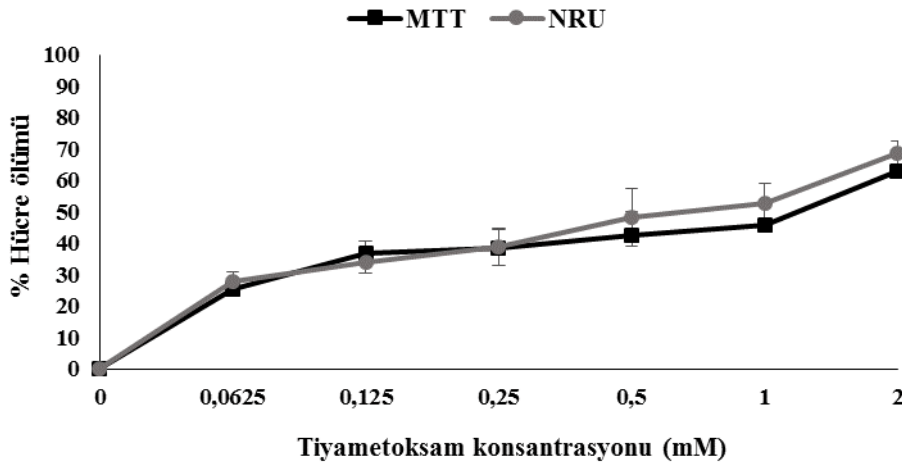
Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

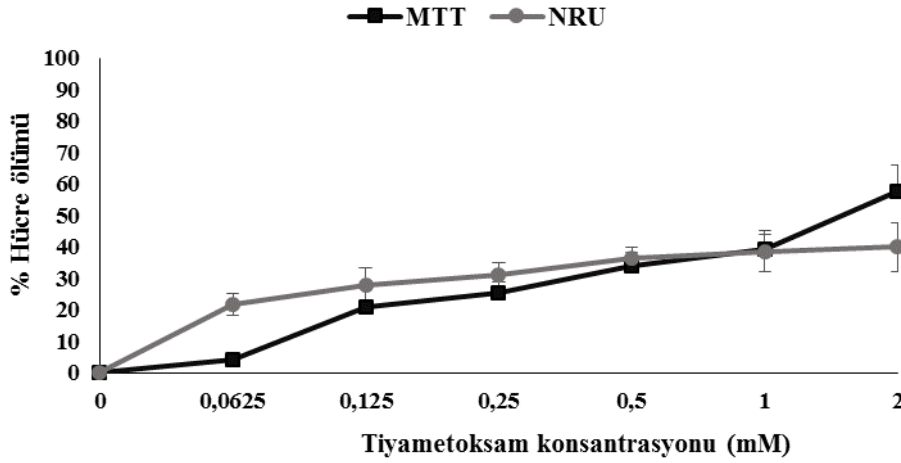
4.2.5. Tiyametoksam

HepG2 hücrelerine 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-19'de gösterilmiştir. Tiyametoksamın HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile 1,17 ve 0,92 mM olarak belirlendi (Tablo 4-10).



Şekil 4-19: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 24 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

HepG2 hücrelerine 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonrası MTT ve NRU testleri ile konsantrasyona karşı hazırlanan % hücre ölümü grafiği Şekil 4-20'de gösterilmiştir. Tiyametoksamın HepG2 hücrelerinde 48 saat maruziyetinde MTT ve NRU testlerine göre IC₅₀ değerleri sırası ile 1,53 ve >4 mM olarak belirlendi (Tablo 4-10).



Şekil 4-20: HepG2 hücrelerine 0-4 mM konsantrasyonlarda 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm değerleri.

Tablo 4-10: HepG2 hücrelerine 0,125-4 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat tiyametoksam maruziyeti sonucu MTT ve NRU testleri ile elde edilen % ölüm ve IC₅₀ değerleri.

Tiyametoksam (mM)	% Hücre ölümü 24 saat		% Hücre ölümü 48 saat	
	MTT	NRU	MTT	NRU
0,063	25,47 ± 2,70**	27,57 ± 3,07**	4,17 ± 0,87	21,78 ± 3,38**
0,125	36,72 ± 3,86**	33,93 ± 3,50**	20,77 ± 0,43**	27,99 ± 5,51**
0,25	38,41 ± 6,11**	38,88 ± 5,86**	25,55 ± 3,21**	31,06 ± 3,78**
0,5	42,42 ± 7,48**	48,24 ± 9,09**	33,95 ± 4,16**	36,43 ± 3,63**
1	45,70 ± 6,28**	52,88 ± 6,02**	39,34 ± 4,61**	38,50 ± 6,50**
2	62,77 ± 5,09**	68,63 ± 4,01**	57,69 ± 8,47**	40,01 ± 7,72**
IC ₅₀	1,17	0,92	1,53	>4

Tüm değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol grubu (çözücü kontrolü) = % 0 ölüm

* Kontrol grubuna kıyasla p<0,05

** Kontrol grubuna kıyasla p<0,001 (ANOVA-post hoc Dunnet testi)

5. TARTIŞMA

Pestisitler tarımdaki verimliliği artırmak amacıyla zararlıları uzaklaştırmak, azaltmak, baskılamak ya da bozmak için kullanılan kimyasal madde yada madde karışımlarıdır. Pestisitlerin yıllarca kullanımı sonucu birçok böcek türünün bu kimyasallara direnç göstermesi nedeniyle, düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteye sahip çevre için daha az risk taşıyan yeni nesil pestisitlerin üretimi ön plana çıkmaktadır. Neonikotinoit grubu pestisitler bu amaçla üretilmiş yeni nesil insektisitlerdendir.

Neonikotinoitler geniş spektrumlu, kalıcı, değme ve mide etkili sistemik insektisitlerdir. Neonikotinoit grubu insektisitler nikotin türevleri olup, N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran, ve klotianidin) ve N-siyanoaminidler (asetamiprid ve thiakloprid) olarak sınıflandırılırlar (Bolboaca ve Jaentschi, 2005). Neonikotinoit grubu insektisitler, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de birçok ürünün korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu grup insektisitlerin tohum kaplamada düşük miktarlarda kullanılması, taşınması, uygulanması, depolanması, maliyetinin düşük olması ve tohum fidelerinde son derece etkili olması bakımından diğer insektisitlere göre daha üstün olduğu belirtilmektedir (Van Duyn, 2004). Neonikotinoitler, hem memelilerde hem de böceklerde post-sinaptik membranda nikotinic asetilkolin reseptöre (nAChR) bağlanırlar ve agonist olarak etki gösterirler (Tomizawa ve Casida, 2003; 2005). Neonikotinoitler, tüm dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunmasında kullanılan en yeni insektisit grubu olup (Casida ve Quistad, 1998), EPA tarafından 2. ve 3. sınıf toksinler grubunda sınıflandırılmıştır (EPA, 2003; WHO, 2009). Bu insektisitlerin özellikle DNA hasarı (Bull ve ark., 2006), kardeş kromatid değişimi (Rupa ve ark., 1991), mikroçekirdek oluşumu (Van Maele-Fabry and ark., 2007), kromozomal anormalliklere (Rupa ve ark., 1988), DNA kırıklarına ve DNA adduktlarına (Peluso, ve ark. 1996) neden olduğu belirtilmiştir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar DNA hasarının sinir, solunum, üreme ve bağışıklık sistemi bozukluklarına (Colosio ve ark., 2005), tümörlerin gelişimine (Dich ve ark.,1997) sebep olduğunu göstermiştir. Thiakloprid karsinojendir ve farelerde yumurtalık tümörü oluşturduğu tespit edilmiştir. (EPA, 2003; WHO, 2009). Tiyametoksam karsinojendir ve dişi erkek farelerde karaciğer tümörlerine neden olur (Green ve ark., 2005). Asetamiprid kardeş

kromatid değişimine, kan lenfositlerinde mikro çekirdek oluşumuna ve kromozomal anormalliklere neden olmaktadır (Kocaman ve Topaktaş, 2007).

Neonikotinoitlerin tarımsal mücadelede faydalarının yanı sıra karsinojenik risk taşıyabilmesi, karaciğer, hormonal ve üreme sistemi üzerine kronik toksik etkiler oluşturması (Colosio ve ark.,2005) nedeniyle tez çalışmasında sıklıkla kullanılan neonikotinoit grubu insektisitlerin (imidakloprid, tiyametoksam, klotianidin, asetamiprid ve thiakloprid) SH-SY5Y ve HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksosite potansiyelleri MTT ve nötral kırmızısı alımı NRU testleri ile değerlendirilmesi amaçlandı.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlarda thiaklopridin SH-SY5Y hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile 1,28 ve 1,16 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 1,20 ve 1,93 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile 1,40 ve 0,40 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 2,38 ve 0,53 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlardan 24 saatlik maruziyette her ikisi hücrede de MTT testi ile IC_{50} değerlerinin anlamlı derecede farklı olmadığı ve HepG2 hücrelerinde ise 24 ve 48 saat maruziyetlerde NRU testi ile thiaklopridin IC_{50} değerlerinin daha düşük olduğu gösterildi.

Asetamipridin SH-SY5Y hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile 2,16 ve 3,09 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 1,83 ve 2,35 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile 3,61 ve 0,56 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise >4 ve 0,61 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlardan SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat maruziyetlerde MTT testi ile IC_{50} değerlerinin anlamlı derecede farklı olmadığı, NRU testi ile 48 saat maruziyette IC_{50} değerinin %23,95 oranında azaldığı gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde ise MTT testi ile 24 ve 48 saatlik maruziyetlerde IC_{50} değerinin $\geq 3,61$ mM olarak belirlenirken, NRU testi ile ise her iki maruziyet süresinde de IC_{50} değerlerinin daha düşük olduğu gösterildi.

Klotianidinin SH-SY5Y hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile >4 ve 2,29 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 3,73 ve 1,09 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC_{50} değeri MTT ve NRU testleri ile 2,78 ve 2,39 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 3,91 ve 2,84 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlardan SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat

maruziyetlerde MTT testi ile IC₅₀ değerlerinin $\geq 3,73$ mM olduğu, NRU testi ile 48 saat maruziyette IC₅₀ değerinin %52,40 oranında azaldığı gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde ise MTT testi ile 48 saatlik maruziyette IC₅₀ değerinin %40,65 mM oranında arttığı belirlenirken, NRU testi ile ise her iki maruziyet süresinde de IC₅₀ değerlerinin arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterildi.

İmidaklopridin SH-SY5Y hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri MTT ve NRU testleri ile 3,69 ve 2,13 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise >4 ve 2,97 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerine 24 ve 48 saat maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri MTT ve NRU testleri ile >4 olarak belirlendi. Bu sonuçlardan SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat maruziyetlerde MTT testi ile IC₅₀ değerlerinin $\geq 3,69$ mM olduğu, NRU testi ile 48 saat maruziyette IC₅₀ değerinin %39,44 oranında arttığı gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde ise her iki maruziyet süresinde MTT ve NRU testleri ile IC₅₀ değerleri hesaplanamamış olup, >4 olarak belirtilmiştir.

Tiyametoksamin ise SH-SY5Y hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri MTT ve NRU testleri ile 1,08 ve 0,65 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise >4 ve 1,22 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerine 24 saat maruziyeti sonucu IC₅₀ değeri MTT ve NRU testleri ile 1,17 ve 0,92 mM olarak 48 saat maruziyeti sonucu ise 1,53 ve >4 mM olarak belirlendi. Bu sonuçlardan SH-SY5Y ve HepG2 hücrelerinde 24 ve 48 saat maruziyetlerde MTT ve NRU testi ile IC₅₀ değerlerinin arttığı gösterilmiştir.

Neonikotinoit grubu insektisitlerin çeşitli hücre kültürlerinde sitotoksik etkileri hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Calderon-Segura ve ark. (2012) insan lenfositlerine thiakloprid (Calypso 480SC), imidakloprid (Gaicho 70 WS) ve klotianidin (Poncho) ticari formlarının 2 saat boyunca maruziyeti sonucunda tripan mavisi testi ile sitotoksitelerini incelemiş ve sırasıyla 200 mM, 2 mM ve 1,07 M konsantrasyonlarının üzerinde sitotoksik olduklarını göstermişlerdir. Çavaş ve ark. (2012) Caco-2 hücrelerine 24 saat asetamiprid maruziyetinin 75-350 μ M konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde hücre ölümüne sebep olduğunu göstermişlerdir. Çavaş ve ark. (2014) yaptıkları diğer bir çalışmada ise IMR-90 akciğer fibroblast hücrelerine asetamiprid maruziyetinin 100-1600 μ M konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde hücre ölümüne sebep olduğunu ve IC₅₀ değerini de 650 μ M olarak göstermişlerdir.

SH-SY5Y hücrelerinde 24 ve 48 saat maruziyet sonucu neonikotinoitlerin IC_{50} değerleri 0,65 - > 4 mM olarak belirlenirken, HepG2 hücrelerinde ise IC_{50} değerleri 0,40 - > 4 mM olarak belirlendi. Neonikotinoitlerin SH-SY5Y hücrelerine kıyasla HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Neonikotinoit grubu pestisitlerin çeşitli sistemlerde sitotoksik etkilerinin araştırılması ile bu grup maddelerin toksisite çalışmalarına katkıda bulunulması insan ve çevre sağlığı açısından risklerinin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların, sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilen neonikotinoit grubu insektisitlerin insan ve çevre sağlığı üzerine toksik etkileri ile ilgili araştırmaların çoğaltılması ve kullanımları konusunda gerekli tedbirlerin alınması hususlarına dikkat çekeceğine inanılmaktadır.



KAYNAKLAR

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48**, 589-601.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission). (1999). Opinion on human and wildlife health effects endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods. (CSTEE) Reports of the Scientific Committee on toxicity, ecotoxicity and environment, Brussel, 5-96.

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission). (2004). Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. Health & Consumer Protection Directorate-General. Acetamiprid, Sanco,1392/2001, 6-7

Avrupa Birliği Komisyonu (European Commission). (2004). Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions. Health & Consumer Protection Directorate-General. Thiometoxam, Sanco,10392/2002.

Bilir, A., Solakođlu, S. Ve Ahışalı , B. (2004). Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu, İstanbul.

Blair, A., and Zahm, S.H. (1995). Agricultural Exposures and Cancer. *Environmental Health. Perspectives*, **103**, 205-208.

Bolboaca, S.D., Jaentschi, L. (2005). Molecular descriptors family on structure activity relationships. 2. Insecticidal activity of neonicotinoid compounds. *Journal of Pesticide Science*, **4**, 78–85.

Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L.M., Burmeister, L.F., Van Lier, S.F., and Dick, F. (1990). Pesticide Exposures and Other Agricultural Risk Factors for Leukemia among Men in Iowa and Minnesota. *Cancer Research*, **50**, 6585-6591.

Browne, R.M. (1988). The *In vitro* Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials-Does It Have a Role? *International Endodontic Journal*, **21**, 50-58.

Brunet, J.L., Maresca, M., Fantini, J., Belzunces, L.P. (2008). Intestinal absorption of the acetamiprid neonicotinoid by Caco-2 cells: transepithelial transport, cellular uptake and efflux. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **43**(3), 261-270.

Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R., and Battershill, J.M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, **21**(2), 93–103.

Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. del C., Cortés-Eslava, J., García-Martínez, R., Flores-Ramírez, D., Rodríguez-Romero, M.I., Méndez-Pérez, P., Bañuelos-Ruíz, E. (2012). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*, **2012**, 612647.

Casida, J., Quistad, G.B. (2004). Why Insecticides are More Toxic to Insect Than People: The Unique Toxicology of Insects. *Journal of Pesticide Science*, **29**, 81–86.

Cavas, T., Cinkılıç, N., Vatan, O., Yılmaz, D. (2014). Effects of fullereneol nanoparticles on asetamiprid induced cytotoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **114**, 1-7.

Cavas, T., Cinkılıç, N., Vatan, O., Yılmaz, D., Coşkun, M. (2012). *In vitro* genotoxicity evaluation of asetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ -H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **104**, 212–217.

Colosio, C., Birindelli, S., Corsini, E., Galli, C.L., Maroni, M. (2005). Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **207**, S320-S328.

Davis, J.M. (1996). Basic Cell Culture. A Practical Approach. Oxford University Press INC., New York.

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. (2005). Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, 35-45.

Dich, J., Zahm, S.H., Hanberg, A., Adami, H.O. (1997). Pesticides and cancer. *Cancer Causes and Control*, **8**, 420-443.

Dursun, O., Taç, G., Eskin, A., Yörük, B., Serçebay, U., Sarı, S., (2008). *Trialeurodes vaporariorum* westfood (Hom.: Aleyrodidae) üzerinde bazı böcek gelişim düzenleyicilerin (IGR) etkisi. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **5**(2), 25-32.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO). (2009). The WHP Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, World Health Organization Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland.

Echobichan, D.J. (1996). Toxic effects of pesticides “Casarett and Doull’s Toxicology” (Ed. C. D. Klassen)’de 5. Edition, Mc. Graw- Hill Co., New York, 643-689.

Eiben, R., and Rinke, M. (1989). Subchronic toxicity study on Wistar-rats (administration in the feed for 96 days).

El Hassani, A. K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2008). Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, **54**, 653–661.

Elbert, A., Becker, B., Hartwing, J., Erdelen C (1991) İmidakloprid-a new systemic insecticide. *Pflanzenschutz-Nachr Bayer*, **44**, 113-136.

El-Gendy, K.S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A., El-Sebae, A.K.H. (2010). The Role of Vitamin C as Antioxidant in Protection of Oxidative Stress Induced by İmidakloprid. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 215-221.

Environmental Protection Agency (EPA). 2003a. - Pesticides - Fact Sheet for Clothianidin; pesticide tolerance, Federal Register, 68, 32390–32400. Environmental Protection Agency (EPA) - Pesticides - Fact Sheet for Thiacloprid, 2003b. http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-014019_26-Sep-03.pdf. Erişim tarihi: 01.09.2015.

Environmental Protection Agency (EPA). 2006. What is a Pesticide? (US EPA definitions). <http://www.epa.gov/minimum-risk-pesticides/what-pesticide>. Erişim tarihi: 01.09.2015.

European Commission, 2006; Review report for the active substance thiamethoxam, finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 14 July 2006 in view of the inclusion of thiamethoxam in Annex I of Directive 91/414/EEC. SANCO/10390/2002 – rev. final, 14 July 2006.

Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2013. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/İmidakloprid_2013_01.pdf. Erişim Tarihi: 15.10.2015.

Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2011. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Acetamiprid.pdf. Erişim Tarihi: 15.10.2015

Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2010. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Thiamethoxam.pdf. Erişim Tarihi: 15.10.2015

Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays; Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **460**, 171-177.

Freshney R.I. (1986). *Animal cell culture: A practical approach*. Oxford: IRL Press Limited.

Freshney, R.I. (1994). *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 3rd edition, Alan R. Liss, Inc., New York.

Garcia, A. M., Benavides, F. G., Fletcher, T. and Orts, E. (1998). Paternal exposure to pesticides and congenital calformations. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, **24**(6), 473-480.

Gilden, R.C., Huffling, K., Ve Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric Gynecologic and Neonatal Nursing*, **39**(1),103-110.

Green, T., Toghil, A., Lee, R., Waechter, F., Weber, E., Noakes, J., (2005). Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans Part 1: Mode of Action Studies in the Mouse. *Toxicological Sciences*, **86**(1), 36–47.

Gündüz, T., (1998). Çevre sorunları. Ankara, 160-175.

Heming, J.C., Davis, A. C., Robinson, W. B. (1954). Flavor and color evaluation of canning crops grown in soil treated with insecticides. **Journal of Food Technology**, **8**, 227.

Honda, H., Tomizawa, M., Casida, J.E. (2006). Insect nicotinic acetylcholine receptors: neonicotinoid binding site specificity is usually but not always conserved with varied substituents and species. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**(9), 3365-3371. <http://www.tarim.gov.tr/ABDGM/Belgeler/AB%20UYUM/bulten/14.pdf>. Erişim tarihi: 01.11.2015.

Huang, N., Lin, S., Chou, C., Hung, Y., Chung, H., Huang, S. (2006). Fatal ventricular fibrillation in a patient with acute imidacloprid poisoning. *American Journal of Emergency Medicine*, **24**(7), 883-885.

Imamura, T., Yanagawa, Y., Nishikawa, K., Matsumoto, N., Sakamoto, T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Journal of Clinical Toxicology*, **8**, 851–853.

ISO 10993. (1999). International Standard 10993. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 7405. (1997). International Standard 7405. Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jenner P. (2001). Parkinson's Disease, Pesticides and Mitochondrial Dysfunction. *Trends in Neurosciences*, **24**(5), 245-246.

Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G.M., Baris, D., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Brown, L.M., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Pottern, L.M., Schwartz, A.G. and Hoover, R.N. (2001). Occupational Exposure to Pesticides and Pancreatic Cancer. *American Journal of Industrial Medicine*, **39**(1), 92-99.

Kagabu, S., (1997). Chloronicotiny insecticides-discovery, application and future perspective. *Rev Toxicol*, **1**, 75-129.

Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. (1998). Veteriner Hekimli_inde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*: 35, Ankara, 222, 232, 273, 276, 355.

Kiriyama, K., Itazu, Y., Kagabu, S., Nishimura, K. (2003). Insecticidal and Neuroblocking Activities of Acetamiprid and Related Compounds. *Journal of Pesticide Science*, **28**, 8-17.

Kocaman, A.Y., Topaktas, M. (2007). *In vitro* evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **48**, 483-490.

Korzeniewski, C., Callewaert, D.M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **64**, 313-320.

Kovganko, N.V., Kashkan, Zh.N. (2004). Advances in the Synthesis of Neonicotinoids. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **40**(12), 1709-1726.

Lima, P. D. L., Yamada, E. S, Costa, E. T., Pessoa, C. O., Rabenhorst, S. H. B., Bahia M. O., Lu, F. C., (1991). Toxicity of pesticides. *Basic Toxicology: Fundamentals*,

Target Organs and Risk Assessment, 2. Edition, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 277-292.

Manson, G., Rancati, M., Bosco, D. (2000). The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid, in preventing transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Crop Protection*, **19**, 473-479.

Marrs, T. C., Dewhurst, I. (2000). Toxicology of pesticide. General and Applied Toxicology. 2. Edition, Macmillan Reference Ltd., New York, 1993-2012.

Martin, B. (1996). The Good News about DDT. Science notes. <http://sciencenotes.ucsc.edu/9601/Sealion/00Intro.html>. Erişim Tarihi: 21.06.2015

McKinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N.B., Voulvoulis, N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: *Implications for risk assessment. Environm. Int*, **34**, 168-183

Mohamed, F., Gawarammana, I. (2009). Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: A neonicotinoid insecticide. *PLOS One*, **4**, article e5127.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1), 55-63.

National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, APVMA, (2001). Evaluation of the new active Thiacloprid in the new product Calypso 480 SC Insecticide. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, Canberra, Australia. <http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14066-prs-thiacloprid.pdf> Erişim Tarihi: 11.07.2015

Nesheim, O. N., Fishel, F. M. and Mossler, M., (2005). Toxicity of Pesticides. UF/IFAS EDIS Document PI-13 (<http://edis.ifas.ufl.edu/PI008>). Erişim Tarihi: 15.10.2015

Nishiwaki, H., Nakagawa, Y., Kuwamura, M., Sato, K., Akamatsu, M., Matsuda, K., Komai, K., Miyagawa, H. (2003). Correlations of the electrophysiological activity of neonicotinoids with their binding and insecticidal activities. *Pest management science*, **59**(9), 1023-1030.

NPIC (National Pesticide Information Center), İmidakloprid technical fact sheet. <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf> Erişim Tarihi: 10.10.2015

Özdemir K.G. (2007). Farklı yumuşak astar materyallerinin sitotoksitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile in vitro olarak değerlendirilmesi.

Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi.

Özdemir, K.G. (2007). Farklı yumuşak astar materyallerinin sitotoksitelerinin fare fibroblastları üzerinde hücre kültürü yöntemi ile *in vitro* olarak değerlendirilmesi. Yayınlanmış doktora tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara.

Peluso, M., Merlo, F., Munnia, A., Bolognesi, C., Puntoni, R., Parodi, S. (1996). 32P-postlabeling detection of DNA adducts in peripheral white blood cells of greenhouse floriculturists from Western Liguria, Italy. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **5**(5), 361-369.

Prabhaker, N., Tascano, N.C., Castle, S.J. & Henneberry, T.J. (1997). Selection for imidacloprid resistance in silver leaf whiteflies from the Imperial Valley and development of a hydroponic bioassay for resistance monitoring. *Pesticide Science*, **51**, 419-428.

Preziosi, P. (1998). Natural and antropogenic environmental oestrogens: The scientific basis for risk assessment. Endocrine distruptors as environmental signalers. *Pure and Applied Chemistry*, **70**, 1617-1631.

Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, **3**, 1125-1131.

Rupa, D.S. Reddy, P.P., Sreemannarayana, K., Reddi O.S. (1991). Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **18**, 136-138.

Rupa, D.S., Rita, P., Reddy, R.R., Reddi, O.S. (1988). Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Human and Experimental Toxicology*, **7**, 333-336.

Rust, M. K. and Saran, R. K. (2008). Toxicity, repellency, and effects of acetamiprid on western subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, **101**(4), 1360-1366.

Ryan, J.A. (2008). Introduction to Animal Cell Culture Life Sciences Technical Bulletin. www.corning.com/lifesciences. Erişim tarihi: 01.11.2015.

Schmalz, G. (1994). Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, **22**, 6-11.

Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clinical Oral Investigations*, **1**, 154-162.

Smith, D.C., Williams, D.F. (2001). Biocompatibility of dental materials. (Vol II). Florida: Boca Raton Crc.

ThermoFisher Scientific. (2014). Cell Culture Basics Handbook. lifetechnologies.com/cellculturebasics

Tomizawa, M., Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanism of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 247-268.

Tomizawa, M., Casida, J.E. (2003). Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annual Review of Entomology*, **48**, 339-364.

Ünal, G., Gürkan, M.O. (2001). İnektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara.

Van Duyn, J. (2004). Neonicotinoid Insecticide Seed Coatings For Protection of Planted Corn Kernels and Seedlings, 78th Annual Meeting of the Southeastern Branch Entomological Society of America, February 15-18, USA. Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S., Lison, D. (2007). A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes and Control*, **5**, 457-478.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, **731**, 237-45.

Viel, J.F. ve Chalier, B. (1995). Bladder Cancer among French Farmers: does Exposure to Pesticides in Vineyards Play a Part? *Occupational and Environmental Medicine*, **52**, 587-592.

Waddel, B.L., Zahm, S.H., Baris, D., Weisenburger, D.D., Holmes, F., Burmeiste, L.F., Cantor, K.P., Blair, A. (2001). Agricultural use of Organophosphate Pesticides and The Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma among Male Farmers (United States). *Cancer Causes Control*, **12**, 509-517.

Wataha, J.C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **86**, 203-209.

Wismer, T., Plumlee, K. H., St. Louis, MO. (2004). Novel Insecticides. *Clinical Veterinary Toxicology*, 184-185.

Wood, A. (2010). Compendium of Pesticide Common Names. <http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>. Erişim Tarihi: 11.11.2015.

Worthing, C. R. (1987). *The Pesticid Manuel. A World Compendium*, Great Britain, 1077 s.

Yamamoto, I., Casida, J.E. (1999). Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. Springer-Verlag, Tokyo, pp 300.

Yao, X.H., Min, H., Lv, Z.M. (2006). Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. *Biomedical and Environmental Sciences*, **19**, 309–314.

Yavuz, O., Şanlı, Y. (1999). Halk sağlığı ve vektör kontrolünde kullanılan pestisitler, pestisit formülasyonları ve uygulama seçenekleri. I. Seminer Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri, 24.

