



**PROBİYOTİKLERİN KRONİK NEONİKOTİNOİD
(ACETAMİPRİD, İMİDACLOPRİD) TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN RATLARDA
ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem SEVİM

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Erol AKPINAR

Prof. Dr. Aristides M. TSATSAKİS

Doktora Tezi-2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROBİYOTİKLERİN KRONİK NEONİKOTİNOİD
(ACETAMİPRİD, İMİDACLOPRİD) TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN RATLARDA ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem SEVİM

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Erol AKPINAR
Prof. Dr. Aristides M. TSATSAKİS**

**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROBİYOTİKLERİN KRONİK NEONİKOTİNOİD
(ACETAMİPRİD, İMİDACLOPRİD) TOKSİSİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN RATLARDA ARAŞTIRILMASI**


Çiğdem SEVİM

Tez Savunma Tarihi : 05.07.2019

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Erol AKPINAR (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdülmecit ALBAYRAK (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Atilla TOPÇU
(Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed YAYLA (Kafkas Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki Jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü 

Doktora Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pestisitlerin Tarihçesi.....	3
2.2. Pestisitlerin Farklı Biyolojik Organizasyon Seviyelerine Etkileri.....	7
2.3. Neonikotinoidler	10
2.3.1. İmidacloprid.....	13
2.3.1.1. İmidacloprid'in Etki Mekanizması	14
2.3.1.2. Böcek nACh Reseptörleri	16
2.3.1.3. Memeli nACh Reseptörleri	16
2.3.1.4. İmidacloprid'in Çevresel Etkileri	17
2.3.1.5. İmidacloprid'in metabolik ürünleri.....	18
2.3.2. Acetamiprid	20
2.3.2.1. Böcek nACh Reseptörleri	20
2.3.2.2. Acetamiprid'in Ekolojik Risk Etkileri Ve Çevresel Akibet Bulguları	20
2.4. Probiyotikler	21
2.4.1. Probiyotiklerin beslenme ve tedavi ortamlarında etkili olabilmesi için gereken özellikleri	23
2.4.2. Probiyotiklerin iddia edilen faydalı özellikleri	25

2.4.3. Probiyotik organizmaların sınıflandırması	26
2.4.4. Probiyotiklerin Olası Etki Mekanizmaları	28
2.5. Probiyotikler ve pestisitlerin ilişkisi	29
2.6. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	32
2.7. Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP)	33
2.8. Interleukin-6 (IL-6).....	33
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları	34
3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Hazırlanışları.....	34
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler	36
3.2. Metot.....	36
3.2.1. Deney Planı.....	36
3.2.2. Ağırlık Ölçümü	37
3.2.3. Biyokimyasal Analizler	38
3.2.4. Patolojik Analizler	38
3.2.4.1. Histopatolojik İnceleme	38
3.2.4.2. İmmunohistokimyasal İnceleme	38
3.2.5. Kalıntı Analizleri	39
3.2.5.1. Spike örnekler ve standart solüsyonların hazırlanması.....	39
3.2.5.2. Doku numunelerinin ekstraksiyon prosedürü	39
3.2.5.3. Sıvı kromatografi ve kütle spektrometresi enstrümantasyonu.....	39
3.2.6. Genotoksik Analiz (Comet Testi).....	40
3.3. İstatistiksel Analiz Değerlendirmeleri	42

4. BULGULAR.....	43
4.1. Haftalara ve Gruplara Göre Ratların Ağırlık Ölçümleri	43
4.2. Biyokimyasal Ölçüm Sonuçları	44
4.3. Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektrometresi Sonuçları (LCMS)	45
4.3.1.Karaciğer Dokusu Kalıntı Analizi	46
4.3.2. Böbrek Dokusu Kalıntı Analizi	49
4.4. Patoloji Sonuçları.....	52
4.4.1. Histopatolojik Bulgular.....	52
4.4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	60
4.5. Genotoksisite Testi Sonuçları (Comet).....	79
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
KAYNAKLAR	96
EKLER	122
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	122
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	123
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	124

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Erol AKPINAR'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Ayrıca Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, Prof. Dr. Zekai HALICI'ya, Prof. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK'a, Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya doktora öğrenimim boyunca katkıları için teşekkür ederim.

Tez kapsamında LC/MS analizlerini yapmamda yardımcı olan ve aynı zamanda tez danışmanım olan Prof. Dr. Aristides M. TSATSAKİS'e, Doç. Dr. Manolis TZATZARAKİS'e ve Dr. Elena VAKONAKİ'ye (Girit Üniversitesi, Yunanistan), patolojik incelemeleri yapan Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, genotoksisite analizlerini yapan Araş. Gör. Dr. Mehtap KARA'ya (İstanbul Üniversitesi, İstanbul) istatistiksel analizlerin yapılması ve yorumlanmasından ötürü Araş. Gör. Ömer ELTAS'a (Atatürk Üniversitesi, Erzurum), bu çalışmayı 2018/ 6537 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve 2211 C - Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen annem Müberra SEVİM ve babam Kenan SEVİM'e teşekkür ederim.

Çiğdem SEVİM

ÖZET

Probiyotiklerin Kronik Neonikotinoid (Acetamiprid, İmidacloprid) Toksikitesi Üzerine Etkilerinin Ratlarda Araştırılması

Amaç: Ratlarda neonikotinoid pestisitler ile oluşturulan kronik toksisite deneyinde; karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin dokusu üzerinde pestisitlerin olası toksik etkilerinin bir probiyotik olan *Saccaromyces Boulardii* ile önlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışma, 72 adet, erkek Wistar Albino türü ratlar üzerinde yapıldı. Acetamiprid 12.4 mg/kg, imidacloprid 5.7 mg/kg ve probiyotik 1×10^9 CFU, 1mg/kg dozlarında 13 hafta boyunca oral olarak verildi. Deney süresi boyunca haftalık ağırlıkları alındı ve kaydedildi. Deney sonunda sevofluran anestezisi altında alınan kan örneklerinden hematolojik, biyokimyasal tetkiklerin yanı sıra, Comet testi ile de genotoksik analizler yapıldı. Alınan organların ağırlıkları tartıldıktan sonra, dokularda Likid Kromatografi/Kütle Spektrofotometri ile imidacloprid, acetamiprid ve metabolitleri olan 6-chloronicotinic acid kalıntı analizi yapıldı. Dokulardaki hasarı tespit etmek için histopatolojik incelemeler yapıldı. Ayrıca beyin dokusunda 8 OHdG ve GFAP, bağırsak dokusunda IL-6 immünpozitiflikleri immünohistokimyasal yöntemler ile tespit edildi.

Bulgular: Ratların haftalık ağırlık değişiklikleri ile biyokimyasal-hematolojik parametrelerde ki değişiklikler de anlamlı bir fark bulunmadı. Probiyotik karaciğer ve böbrek dokusunda acetamiprid birikimini azalttığı ve istatistiksel olarak bunun çok anlamlı olduğu tespit edildi. Probiyotik, imidacloprid birikimini de azalttı fakat bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Probiyotik tedavisi uygulanan pestisit gruplarında beyin dokusunda 8 OHdG ve GFAP ve bağırsakta IL-6 immünpozitifliğinin istatistiksel olarak azaldığı bulunmuştur. Genotoksik analizde ise probiyotik verilen gruplarda bir hasar oluşmadı, sadece acetamiprid grubunda DNA hasarı olduğu bulundu. Histopatolojik inceleme de acetamiprid ve imidacloprid'in incelenen organlarda hasara neden olduğu ancak probiyotik bu hasarı azalttığını da gördük.

Sonuç: Probiyotik olarak kullanılan *Saccharomyces Boulardii*'nin kronik pestisit maruziyetinde dokuları koruduğu, genotoksik hasar oluşmasını önlediği, inflamasyon ve apoptozisin şiddetini azalttığı aynı zamanda karaciğer ve böbrekte imidacloprid ve acetamiprid kalıntılarını azaltarak hasarı önlediği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Acetamiprid, imidacloprid, neonikotinoid, probiyotik, *saccharomyces boulardii*

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Probiotics on Chronic Neonicotinoid

(Acetamiprid, Imidacloprid) Toxicity in Rats

Aim: In the chronic toxicity experiment formed by neonicotinoid pesticides in rats, it was aimed to prevent potential toxic effects of pesticides on liver, intestine, kidney and brain tissues using a probiotic, *Saccharomyces Boulardii*.

Material and method: This study has been performed on 72 male Wistar Albino rats. Acetamiprid 12.4 mg/kg, imidacloprid 5.7 mg/kg and probiotic 1×10^9 CFU 1mg/kg were administered orally for 13 weeks. Weekly weights were measured and recorded throughout the experimental period. Blood samples were taken under sevoflurane anesthesia at the end of the experiment for hematological and biochemical tests as well as the Comet test for genotoxic analysis. After weighing the organs imidacloprid, acetamiprid, and metabolite 6-chloronicotinic acid residue analysis were performed on tissues by Liquid Chromatography/Mass Spectrophotometry. Histopathological examinations were performed to determine the damage in the tissues. In addition, 8 OHdG and GFAP in brain tissue and IL-6 immuno-positivity in the intestinal tissue were determined by immunohistochemical methods.

Results: There was no significant difference in weekly weight changes and biochemical-hematological parameter changes in rats. It was found that probiotic significantly reduced acetamiprid deposition in liver and kidney tissue. Whereas probiotic also reduced imidacloprid deposition, this was not statistically significant. It was found that 8 OHdG and GFAP in brain tissue and IL-6 immuno-positivity in the intestine were statistically reduced in probiotic-treated pesticide groups. The genotoxic analysis revealed no damage in groups which received probiotics, DNA damage was detected only in the acetamiprid group. Histopathological examination also showed that acetamiprid and imidacloprid caused damage to the organs examined but probiotic reduced this damage.

Conclusion: Consequently; it was found that *Saccharomyces Boulardii*, used as probiotic, protected tissue in chronic pesticide exposure, prevented genotoxic damage, decreased the severity of inflammation and apoptosis and also prevented damage by reducing imidacloprid and acetamiprid residues in liver and kidney.

Keywords: Acetamiprid, imidacloprid, neonicotinoid, probiotic, *saccharomyces boulardii*

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

6-CNA	:	6-chloro nicotinic acid
8 OhDG	:	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
AAD	:	Antibiyotiklerle ilişkili ishal
AB	:	Avrupa Birliği
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
ACE	:	Acetamidrid
ACh	:	Asetilkolin
AChE	:	Asetilkolinesteraz
ALP	:	Alkaline phosphatase
ALT	:	Alanine aminotransferase
AST	:	Aspartat aminotransferase
Cd	:	Kadmiyum
COMET	:	Tek Hücreli Jel Elektrofrez
DT50	:	Pestisit uygulanan alanın % 50'sine dağılması için gereken süre
EPAV	:	Victoria Çevre Koruma Otoritesi (Avustralya)
ERA	:	Çevresel Risk Değerlendirmesi
ERK	:	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
GM	:	Bağırsak Mikrobiyotası
HCT	:	Hematokrit
HGB	:	Hemoglobin
IG	:	Immünglobulin
IL-6	:	Interleukin-6
IMI	:	Imidacloprid
IPM	:	Bütünleşik Zararlı Yönetimi

Koc	:	Toprak Organik Karbon-Su Ayrışma Katsayısı
LDH	:	Lactate Dehydrogenase
LGIC	:	Ligand Kapılı İyon Kanalı
LO(A)EL	:	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz
LO(A)EC	:	Gözlenebilen etkinin görüldüğü en düşük konsantrasyon
MAPK	:	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
MCHC	:	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	:	Ortalama eritrosit hacmi
nAChR	:	Nikotinik Asetilkolin Reseptörü
NO(A)EL	:	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz
NO(A)EC	:	Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen konsantrasyon
OECD	:	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PKC	:	Protein Kinaz C
PLT	:	Platelet
RBC	:	Kırmızı kan hücreleri
S.Boulardii	:	Saccharomyces Boulardii
USEPA	:	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
TP	:	Transformasyon Ürünleri
WBC	:	Beyaz kan hücreleri
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. NOEC, LOEC ve EC50 toksisite parametresiyle bir doz yanıt eğrisinin genel şeması.....	8
Şekil 2.2. Sentetik insektisit imidacloprid'in ve neonikotinoid ailesinin yapısı	11
Şekil 2.3. İmidacloprid'in yapısal formülü	13
Şekil 2.4. Nikotinik asetil kolin reseptörünün yapısı.....	15
Şekil 2.5. İnsan CYP450 izozimlerinin IMI metabolizmasındaki alternatif yolları.....	19
Şekil 2.6. Acetamiprid'in kimyasal yapısı.....	20
Şekil 4.1. Karaciğer dokusunda imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 4.2. Deney grupları karaciğer doku örneklerinde imidacloprid ve acetamiprid için elde edilen kalıntı düzeyleri	48
Şekil 4.3. Deney grupları karaciğer doku örneklerinde acetamiprid için elde edilen kalıntı düzeyleri	49
Şekil 4.4. Böbrek dokusunda imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.5. Deney grupları böbrek doku örneklerinde imidacloprid için elde edilen kalıntı düzeyleri.....	51
Şekil 4.6. Deney grupları böbrek doku örneklerinde acetamiprid için elde edilen kalıntı düzeyleri.....	52
Şekil 4.7. Beyin dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	53
Şekil 4.8. Beyin dokusu PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	54
Şekil 4.9. Beyin dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	54
Şekil 4.10. Beyin dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	55

Şekil 4.11. Beyin dokusu IMI grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	55
Şekil 4.12. Beyin dokusu IMI+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	56
Şekil 4.13. Bağırsak dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	57
Şekil 4.14. Bağırsak dokusu PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	58
Şekil 4.15. Bağırsak dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	58
Şekil 4.16. Bağırsak dokusu ACE+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	59
Şekil 4.17. Bağırsak dokusu IMI grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	59
Şekil 4.18. Bağırsak dokusu IMI+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları..	60
Şekil 4.19. Beyin dokusu kontrol grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları.	61
Şekil 4.20. Beyin dokusu PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları.	61
Şekil 4.21. Beyin dokusu ACE grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları.....	62
Şekil 4.22. Beyin dokusu ACE+PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları.....	62
Şekil 4.23. Beyin dokusu IMI grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları	63
Şekil 4.24. Beyin dokusu IMI+PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları.	63
Şekil 4.25. Beyin dokusu kontrol grubu GFAP IHC boyama sonuçları.....	64
Şekil 4.26. Beyin dokusu PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları	65
Şekil 4.27. Beyin dokusu ACE grubu GFAP IHC boyama sonuçları	65
Şekil 4.28. Beyin dokusu ACE+PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları	66
Şekil 4.29. Beyin dokusu IMI grubu GFAP IHC boyama sonuçları	66
Şekil 4.30. Beyin dokusu IMI+PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları.....	67
Şekil 4.31. Bağırsak dokusu kontrol grubu IL-6 IHC boyama sonuçları	68
Şekil 4.32. Bağırsak dokusu PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları.....	69
Şekil 4.33. Bağırsak dokusu ACE grubu IL-6 IHC boyama sonuçları.....	69
Şekil 4.34. Bağırsak dokusu ACE+PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları	70
Şekil 4.35. Bağırsak dokusu IMI grubu IL-6 IHC boyama sonuçları	70

Şekil 4.36. Bağırsak dokusu IMI+PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları.	71
Şekil 4.37. Böbrek dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	72
Şekil 4.38. Böbrek dokusu PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	73
Şekil 4.39. Böbrek dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	73
Şekil 4.40. Böbrek dokusu ACE+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları...	74
Şekil 4.41. Böbrek dokusu IMI grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	74
Şekil 4.42. Böbrek dokusu IMI+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	75
Şekil 4.43. Karaciğer dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	76
Şekil 4.44. Karaciğer dokusu PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	77
Şekil 4.45. Karaciğer dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları.....	77
Şekil 4.46. Karaciğer dokusu ACE+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	78
Şekil 4.47. Karaciğer dokusu IMI grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	78
Şekil 4.48. Karaciğer dokusu IMI+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları	79
Şekil 4.49. Kontrol ve deney grupları Comet analiz sonuçları.....	80

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Pestisit kullanımının tarihi gelişimi	4
Tablo 2.2. Pestisitlerin hedef alınan organizmaya göre sınıflandırılması	5
Tablo 2.3. Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	5
Tablo 2.4. WHO'ya göre pestisitlerin toksisite sınıflaması	6
Tablo 2.5. Neonikotinoidlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.	12
Tablo 2.6. Probiyotiklerde bulunması gereken özellikler	24
Tablo 2.7. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar	26
Tablo 3.1. Kronik toksisite oluşturmada ve toksisitede ki etkilerinin araştırılacağı ticari ürünler	34
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	35
Tablo 3.3. Deneyde kullanılan sarf malzemeler	36
Tablo 3.4. Çalışma için tasarlanan deney grupları ve gruplara göre hayvan sayıları	37
Tablo 3.5. DNA kuyruk yoğunluk analizi için kullanılan genotoksik analiz (COMET) için kullanılan çözeltiler	40
Tablo 4.1. Gruplar 13 haftalık ağırlık ölçüm sonuçları	43
Tablo 4.2. Deney ve kontrol grubu ratların kan ALT, AST ve ALP değerleri	44
Tablo 4.3. Deney ve kontrol grubu ratların kan LDH ve üre değerleri	44
Tablo 4.4. Deney ve kontrol grubu ratların hemogram değerleri	45
Tablo 4.5. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi	46
Tablo 4.6. Karaciğer dokusu için 0, 0.1, 0.25 ve 0.5 µg/g standart madde yüklenmiş örnekler (spiked) ve analiz sonuçları	46
Tablo 4.7. Karaciğer matriksinde imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi ve R-kare değeri	47

Tablo 4.8. Deney gruplarının karaciğer doku örneklerinde ölçülen imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid düzeyleri.....	48
Tablo 4.9. Böbrek dokusu için 0, 0.1, 0.5 ve 2 µg/g standart madde yüklenmiş örnekler (spiked) ve analiz sonuçları	50
Tablo 4.10. Böbrek matriksinde imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi ve R-kare değeri	50
Tablo 4.11. Deney gruplarının böbrek doku örneklerinde ölçülen imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid düzeyleri.....	51
Tablo 4.12. Beyin dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması	67
Tablo 4.13. Bağırsak dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması	71
Tablo 4.14. Böbrek dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması	75
Tablo 4.15. Karaciğer dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması	79
Tablo 4.16. Kontrol ve deney grupları kuyruk yoğunluğuna dayanan Comet analiz sonuçları.....	80

1. GİRİŞ

Probiyotikler, belirli miktarlarda tüketildiğinde konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyel gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır.¹ Probiyotiklerin; pestisitler, ağır metaller ve aflatoksin gibi çevresel toksinlerin emilimini önlediğini gösteren birçok bilimsel çalışma bulunmaktadır.^{2, 3} Çalışmalardan elde edilen sonuçlar probiyotik kullanımının insanların ve hayvanların sağlıklı beslenmesinde ve mikrobiyal enfeksiyonlardan korunmasında ucuz ve güvenli bir yol olduğuna işaret etmektedir.⁴ Probiyotiklerin mide asitliği, safra tuzları, ve çeşitli enzimlere rağmen bağırsağa geçip kolonize olmaları ve canlılıklarını koruyabilmeleri için, düzenli olarak tüketilmesi gerekmektedir.⁵ Birçok bilimsel çalışma düzenli olarak probiyotik ve ürünlerinin alımının vitaminlerin biyosentezine (örneğin, vitamin K) ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna katkı sağladığını, ayrıca mukozal epitel üzerindeki bağlanma yerleri için patojenik mikroplarla rekabet ederek konakçı bağışıklığını güçlendirdiğini ve insan sağlığına birçok alanda katkı sağladığını ortaya koymuştur.⁶⁻⁹ *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*), üstün fizyolojik ve metabolik özellikleri olan bir probiyotik mayadır. *S. Boulardii*, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımına göre (“Yeterli miktarda uygulandığında, konağa sağlık yararı sağlayan canlı bir mikroorganizma”) probiyotik olarak kabul edilmiştir. *S. boulardii*, enfeksiyöz enterit ve *Clostridium-difficile* ile ilişkili enterokolopatilerin önlenmesi ve tedavisi için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Genellikle toksikolojik araştırmalarda laktik asit bakterileri tercih edilmiş ve bunların canlılığını koruyabilmesi, kolonileşmesi ve toksik maddelere bağlanma kapasitesi analiz edilmiştir. *S. Boulardii*'nin çalışmamızda tercih edilme sebebi ise, toksikolojik araştırmalarda kullanıldığına dair literatürde bir çalışmanın bulunmamasıdır. Yine çalışmamızda toksik madde olarak kullandığımız neonikotinoidler de zirai alanda yaygın şekilde kullanıldığı için çalışmamızda tercih edilmiştir. İnsektisitlerin en yeni sınıfı olan neonikotinoidler, delici

emici zararlılara karşı bitki koruma için mükemmel potens ve sistemik etkiye sahiptirler.¹⁰ Özellikle imidacloprid'in (IMI) böceklerde yüksek toksisite göstermesi, dünya çapında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır.¹¹ Acetamiprid (ACE) ise neonikotinoid grubunda üretimine başlanan ikinci bileşik olup, ilk kez mospilan ticari adı ile Japonya'da satışa sunulmuştur. Neonikotinoidler keşfedildikten yaklaşık 20 yıl sonra insektisid pazarına hâkim olmuş ve dünya çapında yıllık satışları 3.5 milyar doları aşmıştır. Neonikotinoidlerdeki aktif maddenin yıllık üretimi 2010 yılında yaklaşık 20.000 ton olduğu tahmin edilmektedir ve 2012 yılında bitki koruma amacıyla yapılan satışların %85'ini neonikotinoidler oluşturmuştur.¹²⁻¹⁴ Neonikotinoidlerin düşük memeli toksisitesine sahip oldukları yönündeki asli inanca rağmen, artan neonikotinoid kullanımının insanlarda, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda nörotoksosite, immünotoksosite, hepatotoksosite, nefrotoksosite ve reproduktif sistem üzerinde ciddi sitotoksik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.¹⁵⁻¹⁷ ACE'nin hepatik membran yapısına zarar vererek, hepatoselüler hasara neden olduğu ve omurgalılarda savunma bariyerlerini bozduğunu ve pro-inflamatuar sitokin artışına sebep olduğu gösterilmiştir.^{18, 19} IMI (2.5, 5 ve 10 mg/kg) 28 günden daha uzun süre farelere uygulandığında, yüksek dozunun özellikle hücre aracılı bağışıklık yanıtını baskıladığı ve gecikmiş tipte aşırı duyarlılık yanıtını azalttığı bulunmuştur. Yapılan çalışmaların sonuçları, IMI'nin 5 mg/kg'dan yüksek dozlarının immünsüpresif etkiye sahip olduğunu ve uzun süreli IMI maruziyetinin bağışıklık sistemine zararlı olabileceğini göstermiştir.²⁰ Bunlara benzer yapılan birçok çalışmada da neonikotinamidlerin pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Bizde çalışmamızda, ratlarda neonikotinoid pestisitler ile oluşturulan kronik toksisite deneyinde; karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin dokusu üzerinde pestisitlerin olası toksik etkilerinin bir probiyotik olan *S. Boulardii* ile önlenilmesini amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitlerin Tarihçesi

Pestisitler, eski çağlardan beri kullanılmaktadır. MÖ 1550 yıllarında yazıldığı sanılan Ebers Papirüslerin de, evlerden pirelerin uzaklaştırılması için yapılması gerekenler için listeler bulunmuştur.²¹ En eski kayıt, evi temizlemek için kükürt yakılması gerektiğini söyleyen Homerus'un Odesa Destanıdır (XXII, 492-494). Romalı bir yazar olan yaşlı Plinius, üç veya dört yüzyıl önce pestisit kullanımına dair birçok anekdot toplamıştır (Shepard, 1939).²¹ Bir Yunan doktoru olan Dioscorides (M.S. 40-90) kükürt ve arseniğin toksik özelliklerini biliyordu. Çinlilerin M.S. 900'lü yıllarda bahçe böceklerini kontrol etmek için arsenik sülfid kullandıklarını gösteren kayıtlar vardır. *Veratrum album* ve *Veratrum nigrum* gibi sahte hellebore türleri Romalılar tarafından rodentisit olarak kullanılmıştır.²¹ Bakır bileşiklerinin 1807'den bu yana mantar öldürücü değeri olduğu bilinmektedir ve *Bordeaux* karışımı (hidratlı kireç ve bakır sülfat) ilk kez 1883 yılında Fransa'da kullanılmıştır.²¹ *Carbon disulfide*, 1854'ten beri böcek fumigantı olarak kullanılmaktadır. Mısırlılar ve Romalılar tarafından zehir olarak bilinen hidrosiyanik asit, böcek koleksiyonlarındaki müze zararlılarını öldürmek için 1877'de bir fumigant olarak kullanıldı.²¹ 1930'ların ortalarına kadar, pestisitler esas olarak doğal kökenli veya inorganik bileşiklerdi. Arsenik, zararlılar ile mücadele de çok önemli bir rol oynamıştır, 1939'da Shepard arsenik için "tehlikeli niteliklerine rağmen her zaman önemli miktarlarda kullanılacak" demiştir.²¹ Nikotin, 1725'ten bu yana Güney Amerika'da bir balık zehiri olarak kullanılan, rotenon gibi dünyayı saran bir böcek ilacı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.²¹ *Mercury chloride*, 1891'den bu yana yaygın bir mantar ilacı olarak kullanıldı ve phenyl (1915), alkyloxyalkyl (1920) ve alkyl (1940) civa gibi organik formları ile yavaş bir şekilde yer değiştirdi.²¹ Halka açık kullanım için ortaya çıkan ilk sentetik organik insektisitler, 1930'lu yılların başında dinitro bileşikleri ve

thiocyanatlardı. 1935 ve 1950 arasındaki dönem, DDT ve diğer *chlorinated hydrocarbon*'lu böcek ilaçlarının gelişimi ile karakterize edildi.²¹ 1940'lı yılların ortalarından itibaren *cyclodiene* tipi *chlorinated hydrocarbonlar* pazara sunuldu.²¹ Pestisit kullanımının tarihi gelişimi Tablo 2.1. de verilmiştir.

Tablo 2.1. Pestisit kullanımının tarihi gelişimi²¹

Pestisit Kullanımının Tarihi Gelişimi	
M.Ö. 1000	Yunanlılar tarafından Sülfür kullanımı
900	Çinliler tarafından Arsenik kullanımı
1763	Nikotin ve ham tütün'ün insektisit olarak kullanılması
1800'ler	<i>Pyrethrinler</i> 'in Asya da ilk kez kullanımı
1848	<i>Rotenoidler</i> 'in ilk kez kullanımı
1939	DDT'nin insektisidal özelliklerinin P.Muller tarafından keşfi
1940-50	<i>Organochlorin</i> 'li insektisitlerin geliştirilmesi
1944	<i>Parathion</i> 'un G. Schrader tarafından sentezi
1950'ler	İnsektisidal karbamatların geliştirilmesi
1963	İlk <i>formamidine</i> pestisit olan <i>Chlordimeform</i> 'un A.G.Schering tarafından sentezlenmesi
1970'ler	Modern <i>pyrethroidler</i> 'in gelişmesi

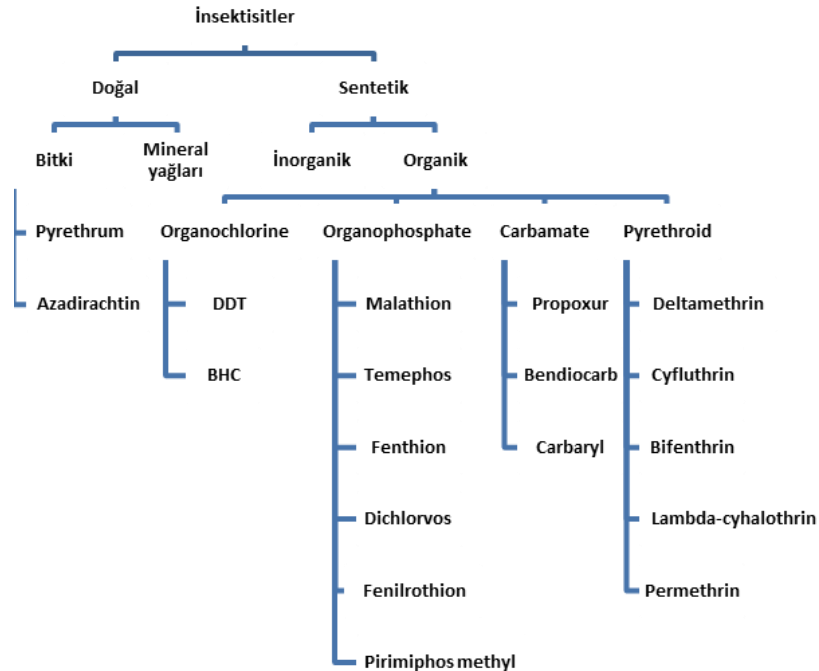
Pestisit kelimesi zararlıları öldürmek için kullanılan insektisit, herbisit, fungusit, rodentisit, ağaç koruyucuları, bahçe kimyasalları ve ev dezenfektanları içeren genel bir terimdir. Sentetik pestisitler ihtiyaç duyulan çeşitli yollara göre sınıflandırılırlar ancak en yaygın sınıflama etki yolu, hedef zararlıya etkisine ve kimyasal kompozisyonuna göre olanlardır. Etki mekanizmasına göre sınıflandırma sistemik ve sistemik olmayan (temas yolu) şeklindedir. Sistemik olmayan pestisitler, bitkilere penetre olmaz ve vasküler sistemlerine karışmaksızın hedef zararlıya temas yolu ile etkilerini gösterirler. Bu gruba *paraquat* ve *diquat dibromide* örnek olarak verilebilir. Sistemik etkili pestisitler bitkilere iyi penetre olurlar ve vasküler sistemlerine geçerek istenilen etkiyi meydana getirirler. Bu gruba 2,4-D ve *glyphosate* örnek verilebilir. Pestisitlerin etkiledikleri hedef zararlılara göre sınıflandırılması Tablo 2.2. de verilmiştir.²²

Tablo 2.2. Pestisitlerin hedef alınan organizmaya göre sınıflandırılması.²²

Pestisit çeşitleri	Hedef organizma
<i>Insecticide</i>	Böcekler
<i>Herbicide</i>	Yabani otlar
<i>Rodenticide</i>	Kemirgenler
<i>Fungicide</i>	Mantarlar
<i>Acaricide ve Miticide</i>	Örümcek akarları
<i>Molluscicide</i>	Yumuşakçalar
<i>Bactericide</i>	Bakteriler
<i>Avicide</i>	Kuş zararlıları
<i>Virucide</i>	Virüsler
<i>Algicide</i>	Algler

Pestisitler için yapılan kimyasal sınıflama, aktif maddenin kimyasal doğasına göre kategorize edilmiştir. Bu çeşit sınıflama pestisitlerin etkinliği, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilgili ipucu vermesi sebebiyle uygulama şekli, oranları ve uygulama sırasında alınması gereken önlemler ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Sınıflandırma 4 ana grup olarak yapılmaktadır; *Organochlorine*, *Organophosphate*, *Carbamate* ve *Pyrethroid*. Sınıflandırma Tablo 2.3. de verilmiştir.²²

Tablo 2.3. Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması



WHO, hayvanların % 50'sinde ölüm meydana getiren medyan öldürücü doza (LD50) ve laboratuvar hayvanlarının davranışlarına göre tehlike sınıflandırması yapmıştır. Bu sıralama düzeni, I'den IV'e kadar olan sayılarla en düşükten en yüksek toksisiteye göre oluşturulmuş, çok tehlikeli, yüksek derecede tehlikeli, orta derecede tehlikeli, hafif derecede tehlikeli olarak sınıflandırılmıştır.²³ Pestisitlerin bu sınıflandırması Tablo 2.4.'de verilmiştir.

Tablo 2.4. WHO'ya göre pestisitlerin toksisite sınıflaması

Sınıf	Toksosite	Örnekler
Sınıf IA	Olağanüstü tehlikeli	<i>Parathion, Dieldrin</i>
Sınıf IB	Yüksek derecede tehlikeli	<i>Eldrin, Dichlorvos</i>
Sınıf II	Orta derecede tehlikeli	<i>DDT, Chlordane</i>
Sınıf III	Hafif derecede tehlikeli	<i>Malathion</i>

Neonikotinoid insektisitlerin keşfi, son otuz yıldır zirai ilaç araştırmalarında bir kilometre taşı olarak düşünülebilir. Bugün, neonikotinoidler pyrethroidlerin ticarileştirilmesinden bu yana piyasaya sunulan en hızlı büyüyen insektisit sınıfını temsil etmektedir.²⁴ 2006 yılında, neonikotinoid ailesi dünya çapında yıllık yaklaşık 1.56 milyar dolarlık satış gerçekleştirmiştir ve bu da küresel böcek ilacı pazarının yaklaşık % 17'sini temsil etmektedir.²⁵ Neonikotinoidler (neonikler), nikotinik asetilkolin reseptörü (nAChR'ler) üzerindeki nörotoksik etkilerinden dolayı böcek öldürücü olarak kullanılan bir kimyasallar sınıfıdır. Organophosphate ve carbamate insektisitlerin mevcut toksik etkilerinin fazla olması yeni ilaç geliştirme arayışlarını doğurmuştur ve bu amaçla geliştirilen neonikler, polen, nektar ve yaprak sıvıları dahil olmak üzere muamele edilmiş bitkilerin tüm kısımlarına ve bu bitkilerden elde edilen yiyeceklere sistemik etkili olarak tasarlanmıştır.^{13,26} İnsektisitler; tarım ve bahçecilikte zararlı böcekler ile mücadele etmek için, ormancılıkta kereste koruma için, su ürünleri yetiştiriciliğinde balıkları koruma için;

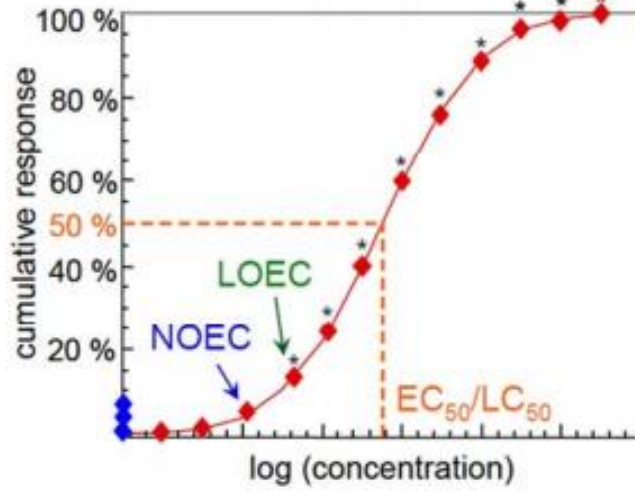
evcil hayvanlar ve hayvancılık da vektör kontrol işlemleri için; kentsel yaşamda da ev haşerelerine karşı mücadele etmek için kullanılırlar.¹³

2.2. Pestisitlerin Farklı Biyolojik Organizasyon Seviyelerine Etkileri

Çevreye salınan pestisitlerin ekosistemdeki uzun vadeli etkilerinden kısa vadeli etkilerine kadar çeşitli olumsuz ekolojik etkileri olabilir. Pestisitler, akut ve kronik toksisiteleri nedeniyle çevresel kirleticiler arasında ayrı bir yere sahiptir. Pestisit uygulamasından sonra (serpme, püskürtme veya tohumların ıslatılması yoluyla püskürtülerek) toprak veya sudaki organizmalar etkilenebilir. Pestisitlerin, direkt hedefi olmayan bu organizmalar üzerindeki dolaylı toksik etkileri ihmal edilmemelidir. Halen tarımda kullanılan bileşikler biyolojik olarak çok aktiftir ancak spesifiklikleri düşüktür.²⁷

Bir pestisitinin toksisitesi, deneysel çalışmalarda artan dozlar verilerek biyobelirteçler aracılığı ile belirlenir. Uygulanan doz ve organizma cevabı arasındaki bu ilişki grafiksel olarak doz-cevap eğrisi olarak gösterilir. Organizmaların % 50'sinden fazlasının öldüğü medyan öldürücü doz (LD50) veya konsantrasyon olan (LC50) belirli bir dozda toksisiteyi tanımlamak için kullanılan yaygın bir ölçümdür. EC_x, maksimum etkinin % x'ine (örneğin, % 10, 20 veya 50) ulaştığı, test numunesinde etkili konsantrasyondur. Daha duyarlı hayvanların ilk önce bir pestisit dozu tarafından etkilendiği doz-cevap eğrisindeki spesifik noktaya eşik seviyesi denir. Eşik seviyesi, eğrinin doğrusal tepki bölgesinin başlangıcıdır ve 'Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz/konsantrasyon' (NO(A)EL/NO(A)EC) ve 'Gözlenebilen etkinin görüldüğü en düşük doz/konsantrasyon' (LO(A)EL /LO(A)EC) arasındaki ayrımdır. NO(A)EC değeri, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye neden olmayan test edilen en yüksek konsantrasyon iken LO(A)EC değeri, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir etki ortaya çıkaran test edilen en düşük konsantrasyondur. Ek olarak, bir pestisitinin etkileri sadece konsantrasyon/doz ile değil aynı zamanda akut (yüksek

konsantrasyonlarda kısa süreli maruz kalma), sub-kronik (orta vadeli maruz kalma) ve kronik (düşük konsantrasyonlarda uzun süre maruz kalma) maruz kalma süresi ile de değişebilir. Doz-yanıt eğrisi Şekil 2.1. de verilmiştir.^{28, 29}



Şekil 2.1. NOEC, LOEC ve EC50 toksisite parametresiyle bir doz yanıt eğrisinin genel şeması. (◇ Kontrol, ◊ tedavi, * kontrole göre anlamlı fark)²⁸

NOEC ve LOEC verilerinin ekotoksikolojide kullanımı 1990'larda yayımlanan bilimsel verilerden sonra ciddi bir şekilde eleştirilmiştir.³⁰⁻³³ Her ne kadar 1998 yılında yapılan bir OECD çalıştayında NOEC'lerin rehberlik ve toksisite testlerinde uluslararası standartlardan çıkartılması tavsiye edilmiş olsa da NOEC ve LOEC tahminleri halen günümüzde OECD istatistik yayımlarında kullanılmaya devam etmektedir. Genel olarak, bu eleştirilere rağmen, NOEC'ler ve LOEC'ler başka bir standartlaştırılmış alternatif bulunmadığı için literatürde sürekli olarak kullanılır ve raporlanır. Pestisitler gibi çevresel kimyasalların, çevresel risk değerlendirmesi (ERA, Environmental Risk Assessment) ağırlıklı olarak laboratuvar toksikolojik analizlere ve daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarına dayanmaktadır. Bu değerlendirme tipik olarak etki tahminleri ve maruz kalma konsantrasyonlarının karşılaştırılmasına dayanır. ERA dört adımda tamamlanır;

tehlike tanımlaması, doz-cevap değerlendirmesi, maruz kalma analizi, ve risk karakterizasyonudur.³⁴

ERA'nın yanı sıra, bu alanda, Amerika Birleşik Devletler (ABD) Bilimler Akademisi tarafından 1969'da resmileştirilmiş Bütünleşik Zararlı Yönetimi (IPM) olarak bilinen ilginç bir terim daha vardır. IPM, büyük ölçüde, zararlıların biyolojik ve kimyasal kontrolünü haşere yönetimi ile birleştiren entegre kontrolün bir kombinasyonudur. Ek olarak, Avrupa Komisyonu Üye Devletleri de IPM standartlarına göre düşük doz pestisit uygulaması ile tarım yapılmasını desteklemektedir. IPM, zararlıları ve neden oldukları hastalıkları ve yabancı otları kontrol etmek için böcek ilacı kullanımını en az düzeye indirmeyi hedeflemektedir. IPM uygulaması ile birlikte standartlar geliştirilmiş ve 2014'ten itibaren Avrupa Birliği (AB) genelinde zorunlu kılınmıştır.³⁵

Genel olarak, toksisite testleri, kimyasalların (örneğin, pestisitlerin) potansiyel insan sağlığı ve çevre üzerine tehlikeli etkilerini belirlemek için yapılır. İnsan toksikolojisi, tanımı gereği, kimyasalların tek bir tür üzerindeki etkileriyle ilgilidir. Bu durumda, araştırma ve testler, tek bir temel amaç için yapılır, oda bireyin sağlığını korumaktır. Pestisitler, insanlarda sağlık sorunlarına yol açabilecek önemli bir kirlenici kaynağı olarak kabul edilmektedir.³⁶ Diğer kimyasalların çoğunun aksine, istenmeyen organizmaları kontrol etmek için kasten çevreye yayılırlar, ancak insanlar gibi hedef dışı yaşam formlarına da ulaşabilirler. Pestisitlere kullandığımız yiyeceklerden, sudan ve havadan maruz kalırız ve bu durumlarda maruz kalma süresi, kirlenici karışımların içeriği, etki şekli değerlendirilmelidir. Bu nedenle tarımda pestisit kullanımı sürekli izlemeye tabi tutulmalıdır.

İnsan toksikolojisinin aksine, sadece kimyasalların farklı türdeki bireyler üzerindeki etkisiyle değil aynı zamanda kimyasalların üst organizma düzeylerine etkisi ile de ilgili olan ekotoksikoloji temel olarak üç farklı disiplinden gelişmiştir: toksikoloji,

uygulamalı ekoloji ve çevre kimyası. Ekosistemler çok sayıda tür içerir ve pestisitler de farklı birçok biyolojik tür üzerine etki gösterirler. Pestisit etkisi basit / doğrudan olabildiği gibi kompleks şekilde gıda ağı ile de indirekt olarak etkileşime geçebilir.^{37, 38} Direkt etkiler, bileşiğin etki mekanizmasına, konsantrasyonlarına ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişebilir.³⁹⁻⁴¹ Pestisit maruziyetinin hassas türler üzerindeki ileriye dönük etkileri; hayatta kalma oranının düşmesi, beslenme bozuklukları, büyümede gecikme ve üreme yeteneği gibi farklı *sub-lethal* son noktalar üzerindeki etkileri içerir.⁴²⁻⁴⁴ Ayrıca pestisit uygulamasından sonra, sularda ki birçok omurgasız türün çeşitliliğinin, yoğunluğunun ve biyokütlesinin azalmasına da dikkat çekilmiştir.^{45, 46}

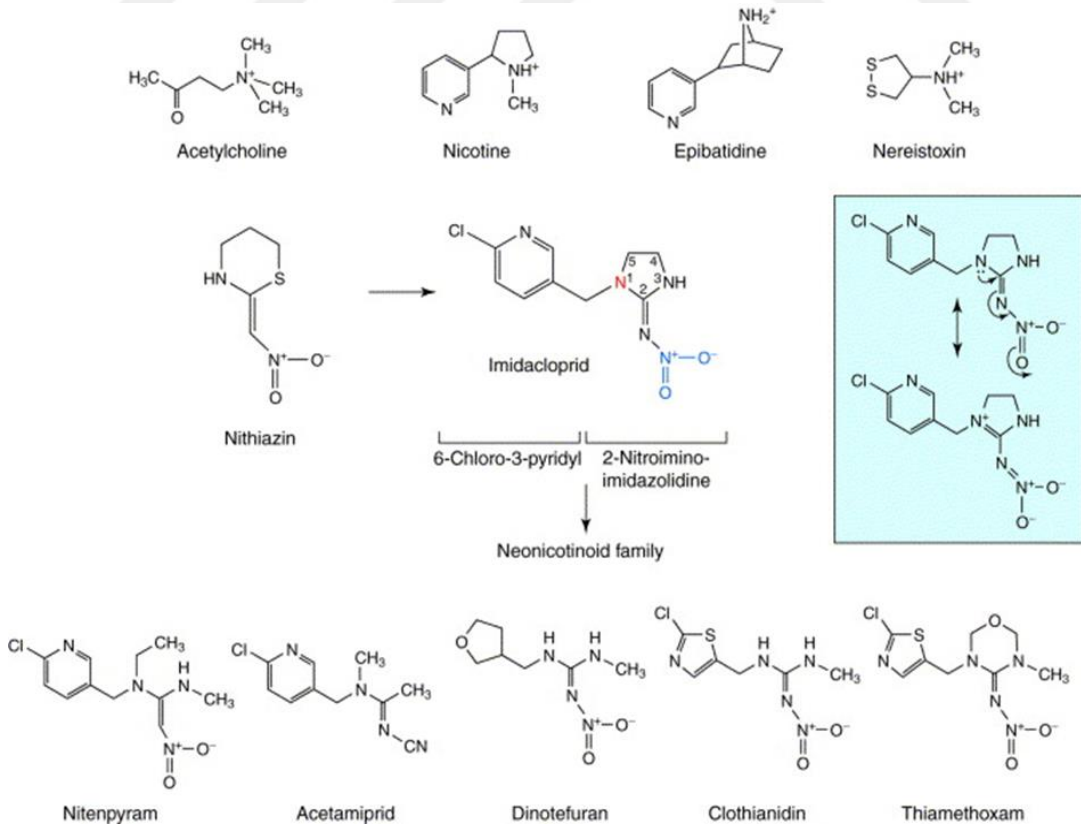
Eko-toksikolojik araştırmalarda, toksik etki mekanizmaları içeren hücresel ve biyokimyasal etki çalışmaları, hücre kültürü ve tüm organizma modellerinde yapılan çalışmalar kadar önemlidir, çünkü kimyasal maddeler ve biota arasındaki birincil etkileşim hücrelerin yüzeyinde veya içinde oluşur. Birlikte ele alındığında, açıklanan bu iki yaklaşım birbirini bütünleştirir ve son olarak kirletici maddelerin (örneğin IMI) canlı sistemler üzerindeki (biyota ve insanlar) etkilerinin anlaşılmasını sağlar.

2.3. Neonikotinoidler

Mevcut sentetik organik insektisitler doğal ürünlerin modifiye edilmesi ile keşfedildi.¹⁰ Nikotin hala Çin'de özellikle bir böcek ilacı olarak kullanılmaktadır fakat *3',4'-dehydronicotine* ve *3-alkylaminomethyl-pyridineler* üzerinden insektisidal aktivitesi geliştirilmeye çalışılmıştır ancak başarılı olunamamıştır.⁴⁷ Neonikotinoidlerin öncüsü, ev sinekleri ve bezelye yaprak bitine karşı orta derecede etkili olan, *2-dibromonitromethyl-3-methylpyridine*, Kaliforniya'daki Shell Development Company de 1970 yılında keşfedilmiştir.⁴⁸⁻⁵⁰ Neonikotinoidler bitki koruma ve pire kontrolü için kullanılan son derece güçlü yeni sınıf insektisitlerdir.⁵¹ Bu sınıf insektisitler *imidacloprid*, *acetamiprid*, *clothianidine*, ve *thiocloprid*'i içerir. Bu insektisitler özellikle $\alpha\beta 2$ alt tipi

nikotinik asetilkolin reseptör (nAChR) agonisti olup nöromusküler paralizi oluşturarak ölüme neden olur.¹⁰ İnsan zehirlenme vakalarında, morbidite ve mortalitenin az olmasının sebebi memelilere kıyasla böceklerde ki nAChR'leri için oldukça seçici olmalarıdır. İnsanlar da maruziyet sonrası klinik veriler de bunu destekliyorsa, bitki korumada daha yaygın olarak kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinin (*organophosphate* ve *carbamate* bileşikleri) yerini alabilirler.^{10, 47-52}

Neonikotinoidler, böcek öldürücü etkisi olan tütün bitkisinden (*Nicotiana tabaccum*) izole edilen nikotinden türetilmiş bir grup insektisittir. Doğal insektisit olarak yaygın olarak kullanılmıştır. Neonikotinoidler omurgasızların nAChR'lerini hedefleyerek, zararlı böceklerin ve helmintlerin etkili kontrolünü sağlarlar.⁵³⁻⁵⁵ 6-chloro-3-pyridilmetil ve nitroimin gruplarının kimyasal birleşimi sonucu IMI adı verilen nikotinik insektisidin ilk tipinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.1).⁵⁶



Şekil 2.2. Sentetik insektisit imidacloprid'in ve neonikotinoid ailesinin yapısı.⁵⁷

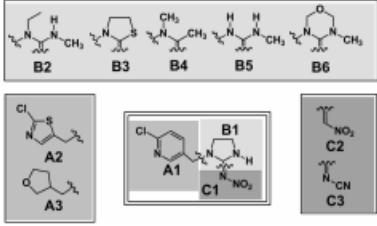
Birçok farklı pestisitler içerisinde organofosfatlar en fazla kullanımı yaygın olanlardır ancak yüksek oranda da toksiktirler, dolayısı ile sürekli olarak yüksek potansiyelli, ancak toksisitesi az yeni bileşikler geliştirilmektedir. IMI de yeni bir insektisittir ve ticari kullanım için geliştirilmiş olan neonikotinoidlerin kimyasal sınıfının ilk üyesidir.⁵⁸ Bu grubun diğer yaygın örnekleri arasında *Acetamiprid*, *Clothianidin*, *Dinotefuran* ve *Thiacloprid* bulunur. IMI, böceklere karşı yüksek öldürücü potansiyelinin olması, düşük memeli toksisitesi ve uzun etki süresine sahip olması amaçlanarak geliştirilmiştir. Hayvan çalışmaları temelinde, "orta derecede toksik" olarak sınıflandırılmıştır (WHO tarafından sınıf 2 ve Victoria Çevre Koruma Otoritesi (EPAV) tarafından zehirlilik kategorisi II). Herhangi bir ülkede yasaklanma, kısıtlanma, iptal edilme durumu yoktur veya yasa dışı değildir.⁵⁹ Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından 1994 yılında bir pestisit olarak kullanılmaya başlanmıştır ve şu anda en çok satan böcek ilaçlarından birisidir.⁶⁰ Delici ve emici zararlılara karşı çok güçlü ve sistemik bir etkiye sahiptir.¹⁰ 7 ana ticari neonikotinoid, 3 yapısal bileşenden (A, B, C) ve 12 farklı substitüentten oluşur.⁶¹ Sınıflandırma Tablo 2.5 de verilmiştir.

Tablo 2.5. Neonikotinoidlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.⁶¹

Neonikotinoid	Bileşik kısaltması	Yapısal bileşenler
<i>Chloropyridinyl (CP)</i>		
<i>İmidacloprid</i>	IMI	A1 B1 C1
<i>Nitenpyram</i>	NIT	A1 B2 C2
<i>Thiacloprid</i>	THI	A1 B3 C3
<i>Acetamiprid</i>	ACE	A1 B4 C3
<i>Clorothiazolyl (CT)</i>	CLO	A2 B5 C1
<i>Clothianidin</i>	TMX	A2 B6 C1

Tablo 2.5. (Devamı)

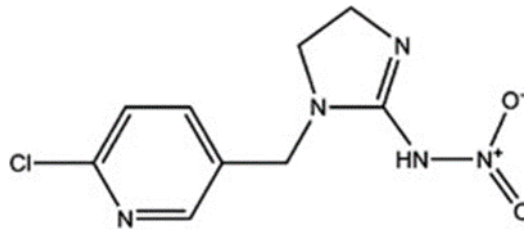
Neonikotinoid	Bileşik kısaltması	Yapısal bileşenler
<i>Thiamethoxam</i>		
<i>Tetrahydrofuryl (THF)</i>		
<i>Dinotefuran</i>	DIN	A3 B5 C1
<i>A heterocyclymethyl</i> kısım		
<i>B heterocyclic</i> veya <i>acyclic</i> halka		
<i>C =NNO₂</i> , =CHNO ₂ veya =NCN		



ACE ve IMI yaygın olarak kullanılan neonikotinoid pestisitlerdir ve böcek nAChR'lerine seçici olarak bağlanırlar.⁶²

2.3.1. İmidacloprid

İmidacloprid [1- (6-kloro-3-piridil metil) -n-nitro imidazolidin-2-iliden amin, CAS No.-138261-41-3] *chloronicotinyl nitroguanidine* grubu bileşiklerin kimyasal familyasının, insektisidal yeni bir sınıfına aittir.⁶³ 255.7 g mol⁻¹'in moleküler ağırlığı ile C₉H₁₀ClN₅O₂ moleküler formülüne sahiptir. Görünüşte, renksiz kristallerden oluşur (Şekil 2.2).

**Şekil 2.3.** İmidakloprid'in yapısal formülü

IMI'nin fizikokimyasal özellikleri nedeni ile yaprak ve tohum tedavisi, toprak sırtı ve kökünü içeren uygulama yerlerinin olması, geniş bir yelpazede kullanışlı olmasını

sağlar.⁶⁴ IMI yeni neslin önemli temsilcilerinden biridir ve patenti 1985 yılında Bayer tarafından alınmış ve 1991 yılında piyasaya sürülmüştür.⁶⁵

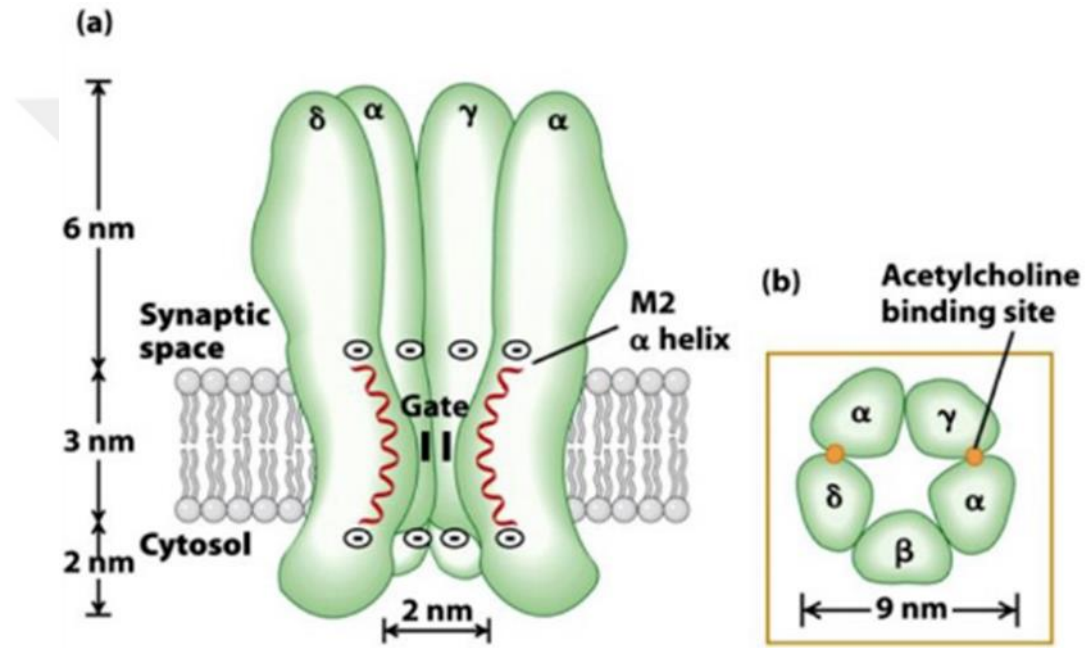
IMI'nin ticari formülasyonları, farklı böceklerin kontrolü için geniş alanlarda kullanılmaktadır.⁶⁶ IMI formülasyonları tohumlar için bulamaç, konsantre, granül, ıslatılabilir toz gibi birçok değişik farmasötik şekillerde bulunabilir.⁶⁷ Tarımsal uygulamalarda etkili bir sonuç elde etmek için birçok farklı çözücüler ile çözülürler ve bu çözücüler IMI'nin toksisitesini ve biyoyararlılığını değiştirebilecek formüller (örn. *dimethyl sulfoxide* (DMSO), *N-methylpyrrolidone* (NMP), *propylene carbonate* ve diğer çözücüler) içerirler. IMI formülasyonları kristal kuvars silika ve naftalin gibi toksik özellikleri olan kimyasalları da içerir.⁶⁸ Bu bileşiklerin toksisitesi ve bunların IMI veya diğer bileşenlerle olası sinerjik etkileri ile ilgili küçük bir endişe bile ciddi olarak dikkate alınmalıdır.^{69, 70} Ticari formülasyonlarının toprak (50 g/ha ile 320 g/ha) ve yaprak (73 mg/L ile 150 mg/L) için farklı konsantrasyonlarda olduğuna dikkat etmek önemlidir. Farklı formülasyonlar için zamanla elde edilen verilerin son değerlendirmesinde, yapraklarda ve işlenmiş bitkilerin çiçeklerinde, yüksek miktarda IMI olduğu ve kalıntı seviyelerinde tekrarlayan uygulamalarda, giderek artış olduğu belirtilmiştir.⁷¹ Veriler, IMI formülasyonlarının yıllık bazda kullanımının sonunda birikim yapabileceğini göstermiştir. Son bulgular nedeniyle, neonikotinoid sınıfı (IMI içeren) içindeki bazı ticari ürünler yeniden değerlendirme altına alınmış ve birikimi önlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur.⁷¹

IMI, diğer yaygın olarak kullanılan pestisitlere kıyasla nispeten kısa bir süredir kullanılabilir, tüm böcek ilaçları içinde dünyadaki en büyük kullanım oranına sahip olmuştur.

2.3.1.1. İmidacloprid'in Etki Mekanizması

IMI'nin etki şekli, nikotinik kolinerjik sinir sistemindeki nörotransmisyonu engellemesine dayanır. IMI, böcekler ve omurgalılarda nöronal ve nöromusküler

bağlantılarda nAChR'lerine bağlanır. nAChR'leri, merkezi katyon geçirgen por çevresinde düzenlenmiş beş zar proteininden oluşan *cys-loop* ligand kapılı iyon kanalı (LGIC) süper ailesinin üyeleridir.⁷² Bu iyon kanalları hızla, uyarıcı kimyasal nörotransmitter asetilkolinin (ACh) etkilerini, sinaps seviyesinde membran depolarizasyonuna dönüştürür. Reseptör normalde kapalı bir durumda bulunur ancak, ACh bağlanmasından sonra, kompleks kanal açılarak katyonlar için geçirgen olur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nikotinik asetil kolin reseptörünün yapısı
(Synaptic space: Sinaptik aralık, Acetylcholine binding site: Asetil kolin bağlanma alanı, Cytosol: Sitozol, Gate: Kapı)

IMI reseptör protein üzerine etki edip sinir hücrelerini uyararak doğal olarak oluşan ACh sinyal tramisyonunu uyarır.⁷³ Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından hızlı bir şekilde bozulan ACh'nin aksine, IMI ya çok yavaş ya da hiçbir şekilde etkisiz hale getirilmez.⁶⁸ IMI tarafından uzun süreli nAChR'nin aktivasyonu desensitizasyonuna neden olur ve reseptörün bloke edilmesi felce ve ölüme neden olur.

2.3.1.2. Böcek nACh Reseptörleri

Yeşil şeftali yaprak biti, beyaz sinek, hamamböceği, göçmen akasya ve meyve sineği dahil olmak üzere birçok zararlı böceklerde nAChR'lerinde yüksek afiniteli IMI bağlanma bölgeleri tespit edilmiştir.^{54, 66, 68-77} 2-nitroimino-imidazolidine grubu, böcek nAChR'lerinin seçiciliğinde kilit bir rol oynar. Neonikotinoidler protonlanmış değildir ve kolayca protonlanmış bir azot yerine, elektronegatif bir nitro veya siyano grubu alabilirler. Bu elektronegatif farmakofor'un da, böcek nAChR'lerinde ki katyonik bir alt bölgeye bağlandığı ileri sürülmektedir.¹⁰ Genel olarak, IMI'nin böcek beyin nAChR'leri üzerindeki afinitesi, memelilerdekine göre önemli ölçüde yüksektir. Örneğin, IMI'nin *Drosophila* sp. reseptörlerine afinitesi memeli reseptörüne olan afiniteden 550 kat daha fazladır.⁷⁸

2.3.1.3. Memeli nACh Reseptörleri

Yapılan çalışmalar, IMI'nin memeli nikotinic reseptörleri ile de etkileşime girdiğini göstermiştir.⁷⁹ IMI'nin bağlanma afinitesi ve agonist potansiyeli bazı omurgalı türleri için bildirilmiştir ve rekombinant $\alpha 4\beta 2$ tavuk nöral nikotinic asetilkolin reseptörleri ve $\alpha 7$ reseptörleri ile parsiyel agonist olduğu gösterilmiştir.^{79, 80} Ayrıca fare BC3H1 kas hücrelerinde ve N1E115 *neuroblastoma* hücrelerinde ki nAChR'leri üzerinde agonist etki gösterdiği bulunmuştur.⁸¹

IMI'ye maruziyeti sonrası reseptör ve hücresel düzeyde meydana gelen birkaç ek etkiyi tanımlamak önemlidir. Pauly ve ark.⁸² yaptığı bir çalışma da IMI'nin (3 günlük maruziyet sonrası) fare M10 hücre hattında $\alpha 4\beta 2$ nAChR alt tipini up-regule ettiğini göstermişlerdir. Bu up-regülasyon genellikle reseptör desensitizasyonu ile ilişkilidir.⁸³ Hücresel düzeyde, nAChR'lerin aktivasyonunun hemen etkisi hücre içi kalsiyum seviyesindeki artış ve daha sonrasında karmaşık bir downstream sinyal yolunu aktive eden membran depolarizasyonudur.⁸⁴

nAChR downstream sinyal yolunda yer alan ana bileşenlerden biri, mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) olarak da bilinen hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazdır (ERK). Tomizawa ve ark.⁶⁵ yaptıkları bir çalışmada IMI, 30 dakika inkübasyondan sonra fare nöroblastom N1E-115 hücrelerinde ERK kaskadını harekete geçirmiştir. IMI'nin $\alpha 4\beta 2$ reseptör uyarımı, ERK'nin Ca^{+2} ve protein kinaz C (PKC) bağımlı şekilde fosforilasyonu ile birleşir. Bu sebeple ERK yolu, nAChR'yi uyarımına katkısından başka birçok spesifik genin ekspresyonuna da aracılık eder.⁸⁵ Birçok insan nöropatolojisi, nAChR genlerinin genetik değişikliklerine bağlanmıştır.⁸⁶ Bu reseptörler ayrıca Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda farklı seviyelerde rol oynamıştır. Uzun süreli ve düşük dozlu pestisit maruziyeti, kanser, üreme sağlığı sorunları ve çeşitli nörolojik bozukluklar gibi hastalıklara sebep olduğunu gösteren az da olsa çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmaların sayıları giderek artmaktadır.⁸⁷

2.3.1.4. İmidakloprid'in Çevresel Etkileri

Tarımda zararlıların kontrolü için kullanılan pestisitlerin uygulanmasından sonra farklı ulaşım ve dönüşüm süreçleri ortaya çıkabilir. Bir pestisit kaderi, ortamın üç ana kompartımanında ki davranışını içerir: hava, toprak ve su. Genel olarak, IMI'nin çevreye yayılmasının ana yolları aquatik fotoliz, mikrobiyal bozunma ve bitkilerin alımıdır.

Hava: IMI'nin bazı formülasyonları, alan dışı bölgelere sürüklenmeye izin veren spreyler olarak uygulanır. IMI'nin düşük buhar basıncı ($20^{\circ}C$ 'de 2×10^{-7} Pa) ve düşük toprak adsorpsiyon katsayısı, toprak ve yapraktan buharlaşma olduğunu gösterir. Bu alandaki sprey uygulamalarından hemen sonra toplanan hava örneklerinde IMI kalıntıları saptanmamıştır.⁸⁸⁻⁹⁰

Toprak: IMI için suda çözünür olması ve düşük Koc değeri (Toprak Organik Karbon-Su Ayrışma Katsayısı), toprak parçacıklarına adsorpsiyonunu azaltır. Yapılan alan çalışmaları ile IMI için geniş bir DT50 değeri olduğu belirlenmiştir. DT50, pestisit uygulanan alanın % 50'sine dağılması için gereken süredir ve IMI için bu değer yaklaşık

80 gün ile 2 yıl arasında değişebilir.^{91,92} Toprakta IMI kalıcılığı, toprak tipi, pH ve toprak örtüsünün varlığı veya yokluğu gibi çok çeşitli faktörlere bağlıdır. Hareketliliği de etkileyen çok önemli faktörler ise, aktif maddelerin kimyasal yapısı ve formülasyon özellikleridir.⁹² Ayrıca, toprak kalitesini iyileştirmek için kullanılan organik maddeler (organik gübreler) IMI'nin toprakta bozulmasını yavaşlatır.⁹³

Su: IMI'nin sudaki çözünürlüğü nispeten yüksektir. Genel olarak, IMI suda kalıcıdır ve kolay biyobozunur değildir.⁹⁴ pH'nin IMI'nin sudaki kalıcılığı üzerinde ki etkileri incelendiğinde, alkali koşullar da yarı ömrünün ve kalıcılığının arttığı gözlemlenmiştir. Normal çevrede ki pH değerlerinde hidrolizi 30 günden fazladır.⁹⁴ Böcek ilacının formülasyonu da ayrıca IMI kalıcılığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin, sudaki Gaucho 70WS toz formülasyonu, Confidor 200SL likid formülasyonundan daha kalıcıdır.⁹⁵

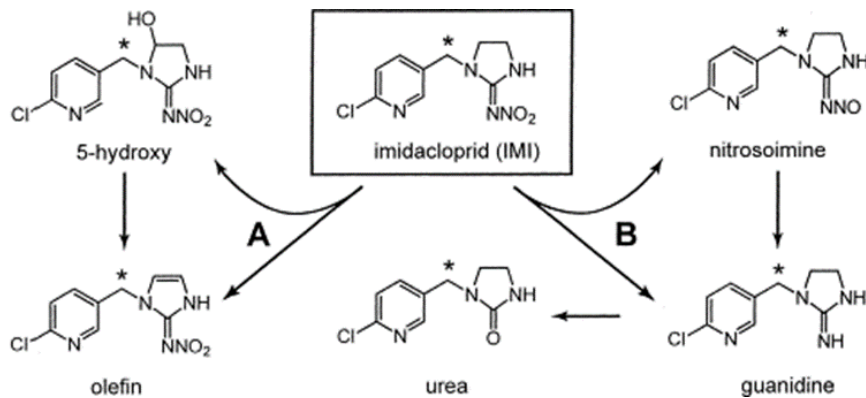
2.3.1.5. İmidacloprid'in metabolik ürünleri

Pestisitler, çevrede, bitkilerde veya organizmalarda, transformasyon ürünleri (TP'ler) adı verilen çok sayıda farklı ürüne dönüşebilirler. Bu metabolik ürünler genellikle bir pestisitinin kendisi tarafından ulaşılamayacak alanlara ulaşabilir. Toprak-su ortamında yüksek polarite ve hareketliliklerinden dolayı, TP'ler ana bileşikten daha kolay yüzey ve yer altı sularına erişebilirler.⁹⁶ Bu ürünler ana bileşikten daha toksik ve daha kalıcı olabilirler.^{97, 98} IMI'nin kimyası, etkinliği veya kararlılığı üç işlemle değiştirilen nitrometilen türevleri üzerinden yürür: (1) *heterocyclic* halkanın bir *imidazolidin* halkasına dönüşmesi; (2) *nitromethylene* grubun nitroiminoya modifikasyonu; (3) bir *pyridine* grubun tanıtılması.⁹⁹ Tüm dönüşüm süreçleri bu üç olası yolla ilişkilidir. Toprakta IMI'nin TP'leri tipik olarak IMI-üre, *6-chloronicotinic acid* (6-CNA) ve *6-hydroxynicotinic acid*.⁹³⁻¹⁰⁰ IMI degrade oldukça suda daha fazla çözünür ve sulu alanlara daha yüksek konsantrasyonda sızar ve kirlilik yaratma potansiyeli daha da artar. 6-CNA, IMI'nin nihai dönüşüm ürünlerinden biridir ve suda yüksek çözünürlüğü (2 g/L^{-1}) nedeniyle topraktan sulu ortama sızabilir.

IMI'nin sudaki başlıca fotoliz yıkım ürünü *6-chloronicotinic aldehyd*, *6-chloro-N-metil nikotin acid amide*, *6-chloro-3-piridil metil etilen diamid*, IMI-üre, *6-hydroxynicotinic acid* ve küçük bir kırılma ürünü IMI-guanidindir.¹⁰¹ Mahsüller tarafından alınan IMI, desnitro-IMI, 5-hidroksi IMI ve 6-CNA dahil olmak üzere birçok ana ürüne metabolize edilir.

Hayvanlardaki neonikotinoid bileşiklerinin in vivo metabolizması yoluyla üretilen TP'ler (fare ve rat) çok sayıda ve iyi bilinen metabolitlerdir. IMI'nin metabolizması karmaşıktır ve keçilerde, kemirgenlerde ve yumurtacı tavuklarda incelenmiştir.¹⁰ Şekil 2.5' de gösterildiği gibi ratdaki IMI metabolizması için iki ana yol mevcuttur.¹⁰ İlk rotada IMI, oksidasyon ile imidazolidine ve bu da 6-CNA'ya hidroliz edilir. İkinci yol, imidazolidin halka hidroksilasyonu (4- ve 5-hidroksi-IMI oluşumu), ardından suyun elimine edilmesi ve olefin-IMI oluşumunu içerir.^{102, 103}

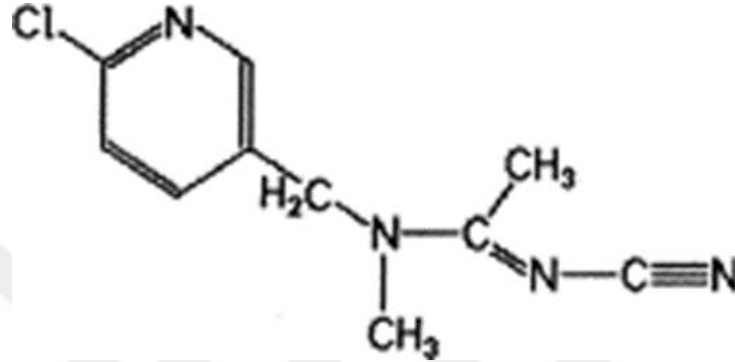
IMI biyotransformasyonunda önemli enzimler sitokrom p450 (karaciğer mikrozomal CYP450) ve sitozolik aldehit oksidazdır (AOX).¹⁰⁴ CYP3A4, IMI'nin imidazolidin halkasını okside eder ve nitroguanidin süstituentini azaltır; AOX, IMI'nin nitroguanidin kısmını azaltır.^{91, 105-107} Neonikotinoidin metabolizasyonu bunların nAChR üzerindeki toksisitesini ve etki potansiyelini azaltabilir veya arttırabilir.



Şekil 2.5. İnsan CYP450 izozimlerinin IMI metabolizmasındaki alternatif yolları. (A) 5-hidroksi ve olefin türevlerini vermek üzere imidazolidin parçasının hidroksilasyonu ve desatürasyonu. (B) Nitrosoimin, guanidin ve üre türevlerini oluşturmak için nitroimin vericisinin indirgenmesi ve bölünmesi. Yıldız işaretleri, trityum etiketlemenin pozisyonlarını belirtir.¹⁰⁶

2.3.2. Acetamiprid

Acetamiprid ((E) -N1 - [(6-kloro-3-piridil) metil] -N2-siyano-N1-metilasetamidin), 135410-20-7 CAS numaralı, sistemik ve geniş spektrumlu bir insektisit olup kloronikotin sınıfına ait bir pestisitir (Şekil 2.6).¹⁰⁸



Şekil 2.6. Acetamiprid'in kimyasal yapısı.¹⁰⁹

2.3.2.1. Böcek nACh Reseptörleri

Acetamiprid de imidacloprid gibi bir *6-chloro-3-pyridyl* kısmı içerir ve bu nedenle her ikisi de nAChR'lerin güçlü agonistleridir ve yapısal olarak nikotin ve epibatidine benzerler. Liu ve ark. ve Buckingham ve ark. çeşitli neonicotinoidlerin olası toksisitelerinin, böcek nAChR için gösterdikleri afinite ile yakından ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir.^{110, 111}

2.3.2.2. Acetamiprid'in Ekolojik Risk Etkileri Ve Çevresel Akibet Bulguları

EPA 15 Mart 2002 tarihli pestisit ve zehirli maddeler bildirisinde ACE'nin çevresel riskleri ve akibeti ile ilgili şunlar yayınlanmıştır.¹¹²

Çevresel Akibet

- ACE aerobik toprak metabolizması ile hızlıca ayrışır
- Düşük kullanım oranı ve hızlı bozulma nedeni ile toprak için risk oluşturmaz
- İçme suyundaki çevresel kalıntılarının düşük olduğu tahmin edilmektedir.
- ACE, balıkta ve tortullarda biyolojik olarak birikmez.

- ACE, diğer birçok insektisitlere göre çevreye düşük toksisite riski oluşturur

Ekolojik Etkiler

- ACE kullanımı balık ve yaban hayatı için asgari risk oluşturur
- ACE'nin toksisitesi böceklere karşı seçicidir, ancak bazı kullanımlar hedef dışı su omurgasızları için risk oluşturabilir.

- ACE sadece arılar için orta derecede toksiktir.
- ACE kullanımı, tehdit altındaki ve tehlike altındaki türler için genellikle düşük risk oluşturur

- ACE kullanımı, hedef dışı bitkiler için minimum risk oluşturur

ACE, 22 C⁰ de pH'sı 4, 5, 7 ve 9 çözeltilerde nispeten kararlıdır. Suda fotolizi 25C⁰ de pH 7'de 34 günlük yarı ömre sahiptir.

Mevcut veriler, ACE'nin hızlı bozulduğu için yer altı sularına sızma potansiyelinin daha az olacağını göstermektedir. Bileşik için birincil bozunma yolu, aerobik toprak metabolizmasıdır, bu da toprakta hızlı biyobozunmaya yol açar.

Metabolitlerinin yer altı suyuna sızma potansiyeli, ana kimyasal maddeden daha yüksektir. Ana bozunma ürününün çevredeki hareketliliği ve kalıcılığı, yeraltı suyu kirlenmesine neden olabilir. Ancak, tüm kullanım alanlarında bu tür kirlenmenin toksikolojik öneme sahip olmayacağı yönündedir.¹¹²

2.4. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunancadan "yaşam için" olarak tercüme edilmiştir. İlk tanım Parker tarafından 1974 de : 'Organizmalar ve bağırsak mikrobiyal dengesine katkıda bulunan maddeler' olarak yapılmıştır ancak bu tanım daha sonra Fuller tarafından 1989 yılında : " Bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçıyı yararlı bir şekilde etkileyen canlı bir mikrobiyal gıda takviyesi " olarak tanımlamıştır. Bu son versiyon en yaygın kullanılan tanımdır ve bilimsel olarak yaygın bir kabul kazanmıştır. Bir probiyotik

bu nedenle bağırsak sağlığına faydalı olduğu görülen canlı mikroorganizmaları diyetle dahil edecektir.¹¹³

Probiyotiklerin uzun bir tarihi vardır. Aslında, insanlar tarafından bakteriyel içeceklerin alımının ilk kayıtları 2000 yıldan daha eskidir. Ancak, bu yüzyılın başında probiyotikler ilk olarak Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde Metchnikoff'un çalışmaları ile bilimsel bir temele oturtulmuştur. Metchnikoff (1907), Bulgar köylülerinin uzun ömürlü olduğunu gözlemlemiş ve bunu da ekşi süt alımını artırmaları ile ilişkilendirmiştir. Bu çalışmalar sırasında, normal bağırsak mikroflorasının konak üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceğini ve bazı bakteri tüketiminin bu etkiyi tersine çevirebileceğini varsaymıştır. Metchnikoff, şu anda geleneksel yoğurt üretiminde sütü mayalamak için kullanılan *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ile *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* olarak adlandırılan saf kültürleri kullanarak tedaviyi geliştirmiştir. Daha sonraki araştırmalar, bağırsakta bakteri izolatlarının probiyotik olarak kullanımına yönelik yapılmaktadır. Yıllar geçtikçe birçok mikro organizma türü kullanılmıştır. Bunlar esas olarak laktik asit üreten bakterilerden (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Laktococcus*, *Bifidobacterium*) ve ayrıca *Bacillus spp* ve *Saccharomyces spp.* ve *Aspergillus spp* gibi mantarlardan oluşur.¹¹³

Yaygın probiyotik kullanımına rağmen, yaklaşımın bazı zorlukları olabilir. Kullanılan bakteriler genellikle anaerobiktir ve aşırı sıcaklığa maruz kalamazlar. Etkili olabilmeleri için, probiyotik geniş bir spektruma sahip olmalıdır. Kullanım sırasında ve depolamada probiyotik canlı ve kararlı kalmalı ve bağırsak ekosisteminde hayatta kalabilmeli ve konakçı da probiyotikten faydalanmalıdır. Bu nedenle, ekzojen bakterilerin bağırsaklara sağlam ve uygulanabilir bir formda ulaşması ve yerleşmesi ve avantajlarını sergilemesi önerilmektedir. Bunu yapabilmek için, mikropların gastrointestinal sistemdeki bir takım fiziksel ve kimyasal engelleri aşması gerekir. Bu

engelleri de mide asiti ve safra asit sekresyonu oluşturur. Ayrıca, kolona ulaşmak üzerine probiyotiklerin muhtemel bir strese maruz kalıp hayatta kalma şansları tehlikeye girebilir.¹¹³

2.4.1. Probiyotiklerin beslenme ve tedavi ortamlarında etkili olabilmesi için gereken özellikleri

Beslenme durumunu ve/veya konağın sağılığını geliştirmek için ekzojen veya endojen olarak bir probiyotik kullanılabilir. Ekzojen kullanım durumunda, mikroorganizmalar en yaygın olarak çeşitli yiyecekleri mayalamak için kullanılır ve bu işlem sayesinde besinleri biyolojik olarak kullanılabilir hale getirebilir ve koruyabilir. Ek olarak da, mikroorganizmalar, yoğurttaki laktoz gibi şekerleri metabolize edebilir ve bu yiyeceğı laktoz intoleransından muzdarip olan kişiler tarafından tüketilebilecek hale getirebilirler. Ekzojen olarak kullanılan probiyotiklerin faydalı olabilmeleri için gereken özellikler, yiyecek ve organizmanın bulunacağı yerde üreme kabiliyeti ve yukarıda bahsedilen olası yararlı etkilerinin sonucundaki spesifik metabolik özellikleridir. Seçilen organizmanın terapötik ve nutrisyonel olarak faydalı olması, istenen spesifik özelliklerine bağılı olacaktır. Bu, klasik biyolojik seçim teknikleri veya genetik mühendisliğı ile sağılanabilir. Gastrointestinal kanalda bir etki göstermek için konakçı tarafından alınan probiyotikler belirli özelliklere sahip olmak zorundadır.^{113, 114}

Probiyotik suşun aktif olduğı yerde yaşayabilmesi çok önemlidir. Daha uzun ve belki de daha yüksek bir aktivite için, türün bu spesifik konumda çoğalarak kolonileşmesi gerekir. Muhtemelen sadece konakçıya özgü mikrobiyal türler, yerli mikroflora ile rekabet edebilmekte ve nişleri kolonize edebilmektedir. Ayrıca, probiyotik suşu bağışıklık sistemi tarafından tolere edilmeli ve probiyotik suşuna karşı antikor oluşumuna neden olmamalıdır. Bu nedenle, konakçı probiyotiğe immün toleranslı olmalıdır. Öte yandan, probiyotik suş bir adjuvan olarak hareket edebilir ve bağışıklık sistemini

patojenik mikroorganizmalara karşı uyarabilir. Bir probiyotiğin konakçı için zararsız olması gerekmektedir.^{113, 114}

Mikroorganizmanın kendisi, fermantasyon ürünleri veya bakterilerin azalmasından sonra, lokal veya genel patojenik, alerjik ve mutajenik/kanserojen reaksiyonlar provoke edilmemelidir. En önemli özelliklerinden biri de türün genetik olarak stabil olmasıdır. Belirli faydalı özelliklerin yanı sıra, iddia edilen bilimsel değerlerini belirlemek için bu genel şartların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu gereksinimler bir dizi in vitro deneyler sırasında taranabilir. İşleme koşulları ve saklanması sırasında, probiyotik suşlarının kültür koşulları ve canlı kalabilirliği gibi in vitro olarak test edilebilecek asgari gereksinimler için bir dizi kararların (kuralların) olması gerekmektedir. Örneğin düşük pH değerleri, mide, safra, bağırsak, pankreas salgılarına ve bağırsak veya solunum yolu mukusuna duyarlılık, patojenik mikroorganizmalarla etkileşimler önem taşır. Bu in vitro deneyler başarılı olursa, hayvanlar veya insanlarda in vivo deneyler sırasında daha fazla araştırma yapılabilir (Tablo 2.6).^{113, 114}

Tablo 2.6. Probiyotiklerde bulunması gereken özellikler

• Aktif olması gereken yerdeki çevresel koşullarda yaşayabilmesi
• Aktif olduğu yerde çoğalma ve / veya kolonizasyon
• Probiyotik suşa karşı bağışıklık reaksiyonunun olmaması
• Probiyotik suşun kendisi tarafından ya da fermentasyon ürünleri veya bakteri azalmasından sonra kendi hücre komponentlerinin patojenik, toksik, alerjik, mutajenik veya kanserojen reaksiyon göstermemesi
• Genetik olarak stabil ve plazmid transferinin olmaması
• Kolay ve tekrar üretilebilir olması
• İşleme ve depolama sırasında yaşayabilir olması

2.4.2. Probiyotiklerin iddia edilen faydalı özellikleri

Şimdiye kadar, mikrofloranın, konakçıya özgü ve yere özgü bileşiminin çok karmaşık olduğu ve konakçı için yararlı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. İnsanlar için spesifik mikrobiyal suşların önemli rol oynayabileceği belirtilmektedir. Bunlar;

- Kemik iliği nakli ile bağlantılı olarak antibiyotiklerle gastrointestinal dekontaminasyondan sonra,
- Bağırsak, solunum ve ürogenital yolların mikroflorasının kolonizasyon direncinin artırılması,
- Serum kolesterol seviyesini düşürmek,
- Bağırsak içeriklerinin mutajenesinin inhibe edilmesi ve bağırsak tümörlerinin görülme sıklığının azaltılması,
- Bağışıklık sistemi ile spesifik olmayan etkileşimler,
- Laktozun metabolize edilmesi ve böylece laktoz intoleransının azaltılması,
- Yaşlı insanlarda kalsiyum emilimini arttırmak ve böylece kemiklerin kireçlenmesini engellemek,
- Vitaminlerin sentezi ve proteinlerin sindirimi

Probiyotik yiyecekler giderek daha popüler hale gelmektedir. *Bifidobacterium sp.*'un birçok sağlık yararları ileri sürülmektedir ve bu nedenle bu organizmaların diyetle dahil edilmesinin sağlığın korunmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Probiyotiklerin aynı zamanda antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu iddia edilmektedir ve etkilerini prokarsinojenlerin ortadan kaldırılması, prokarsinojenik enzimlerin modülasyonu ve tümör baskılanması ile gösterdikleri bilimsel çalışmalarda ifade edilmektedir. Ayrıca, probiyotik tüketimi antibiyotik tedavisi sonrası bağırsak florasında ki dengeyi yeniden kurmak için ideal yöntemdir. Fermente süt ve yoğurt gibi spesifik süt ürünlerindeki bakteriyel kültürlerin faydalı yönleriyle ilgili artan bir uzlaşma vardır. Deneysel ve

epidemiolojik çalışmalar, sütün fermente edilmesi için rutin olarak kullanılan fermente süt ve bakteri kültürlerinin bazı kanser türlerinin riskini azalttığına ve bazı tümörlerin ve tümör hücrelerinin büyümesini engellediğine dair kanıtlar sunar.^{113, 114}

2.4.3. Probiyotik organizmaların sınıflandırması

Günümüzde probiyotik olarak kullanılan birçok farklı mikroorganizma vardır.

Tablo 2.7. Probiyotik üretiminde kullanılan bazı mikroorganizmalar¹¹⁵

İnsanlar için kullanılanlar	Hayvan beslemede kullanılanlar	
L. acidophilus	L. acidophilus	B. mesentericus
L. casei Shirota	L. casei	B. licheniformis
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	L. delbrueckii subsp.	B. subtilis
L. johnsonii	L. plantarum	B. natto
L. reuteri	L. reuteri	B. toyoi
L. rhamnosus	L. fermentum	Pediococcus pentosaceus
Bifidobacterium adolescentis	L. brevis	Aspergillus oryzae
B. bifidum	L. helveticus	Candida pintolopesii
B. breve	B. bifidum	Saccharomyces cerevisiae
B. longum	B. brevis	Torulopsis spp.
B. infantis	B. pseudolongum	Pediococcus acidilactici
S. salivarius subsp. thermophilus	B. thermophilus	Enterococcus faecium
Saccharomyces boulardii		

Lactobacillus türleri: *Lactobacillus*, insan gastrointestinal ve genitoüriner kanallarında zorunlu ve fakültatif anaerob olan bir grup laktik asit üreten gram pozitif basildir. *Laktobacillus* adı, bakterinin laktoz sindirme yeteneğinden ziyade, laktik asit üretme kabiliyetini ifade eder. Bunlar "dost" bakteriler olarak kabul edilir ve büyüme faktörlerini teşvik etmek ve minerallerin biyoyararlanımını arttırmak dahil olmak üzere GIS de yeniden kolonize edilmeleri amacıyla alınır¹¹⁵⁻¹¹⁷

Lactobacilli ayrıca mukozal bariyeri stabilize eder ve *C. difficile*'nin neden olduğu ishal, kramp ve daha az yaygın psödomembranöz kolit (PMC) gibi yan etkileri bağırsak geçirgenliğini azaltarak iyileştirebilir.

Bifidobacterium türleri: *Bifidobacterium*, anaerobik, gram pozitif, spor içermeyen, pleomorfik bir basildir. *Bifidobacterium* cinsindeki bakteriler, glikoz kullanımının yan ürünleri olarak laktik ve asetik asit üretir. *BB536*, ilk olarak sağlıklı bebeklerin bağırsak kanallarından izole edilen bir tür probiyotik bakteridir. *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* türleri ve probiyotik maya *Saccharomyces boulardii* ile birlikte, *Helicobacter* tedavisinin olumsuz etkilerini azalttığı belirtilmiştir.^{115, 118}

Bacillus türleri: *Bacillus coagulans*, laktik asit üreten bir Gram-pozitif basildir ve bu nedenle genellikle laktobasil gibi laktik asit bakterileri olarak yanlış sınıflandırılır. *B. coagulanlar*, *laktobasillus* ve *bifidobacterium* gibi diğer probiyotiklere benzer şekilde terapötik olarak kullanılır; ancak, *B. coagulans* normal insan florasının bir bileşeni değildir. Normal florayı restore etmede etkili olmak ve patojenik kolonizasyonu önlemek için, probiyotiklerin bağırsak mukozasında kalıcı olma ve kolonileşme kabiliyetine sahip olmaları gerekir. *Bacillus* sporu insanlar tarafından alındığında, sporun bağırsakta çimlenme yeteneğine sahip olup olmadığı veya kolonizasyonun meydana gelip gelmediği bilinmemektedir. *B. coagulanlar*, çeşitli mekanizmalar yoluyla patojenik bakteri kolonizasyonunu azaltabilirler. *B. coagulanlar*, antibakteriyel aktiviteye sahip olan ve bu mekanizma yoluyla patojenik bakteri üremesini azaltabilen koagulin ve laktik asit üretir. Hayvan çalışmaları basil sporlarının yutulmasının bağışıklık yanıtını arttırdığını göstermektedir.^{115, 119}

Saccharomyces spp.: *Saccharomyces cerevisiae* olarak da bilinen *S. boulardii*, çoklu etiyojilerden kaynaklanan ishalin tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan, patojenik olmayan bir maya türüdür. *S. boulardii*, Çin hindi'de bulunan tropik meyvelerin kabuklarından izole edilmiştir. Çin hindi yerli halkı uzun zamandır bu meyve kabuklarını ishali önlemek ve tedavi etmek için kullanmıştır. *S. Boulardii*, canlı maya organizmalarının liyofilizasyonu (dondurarak kurutma) ve laktoz kullanılarak kapsül

şeklinde hazırlanır. *S. boulardii*, diğer *S. cerevisiae* suşlarından fenotipik kriterler ile ayırt edilemez. Karşılaştırmalı moleküler çalışmalar, *S. Boulardii*'nin genetik olarak *S. cerevisiae* ile çok yakın ve neredeyse aynı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, metabolik ve fizyolojik olarak, *S. boulardii*, özellikle bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılması için önemli özellikler olan büyüme verimi, sıcaklık ve aside karşı direnç ile ilgili olarak *S. cerevisiae*'den farklı bir davranış sergiler.¹²⁰

2.4.4. Probiyotiklerin Olası Etki Mekanizmaları

Probiyotiklerin yararlı etkilerini gerçekleştirdikleri mekanizmalar tam olarak açıklanmamıştır. Bununla birlikte, olumlu etkilerinin çoğunu açıklayan çeşitli mekanizmalar vardır.¹²¹

Bu mekanizmalardan biri, GIS epitel hücrelerine bağlanma için diğer patojen mikroorganizmalar ile yarışmasıdır. Pek çok patojenik organizma, etkili bir şekilde kolonileşmek için GI sistem epiteli ile birleşmelidir.¹²² Ancak bazı bifidobacteria ve lactobacilli türleri, epitellere yapışabilir ve patojenlerin mukozaya yapışmasını önleyerek "kolonizasyon bariyerleri" olarak hareket edebilir.¹²³ Bu etki *Lactobacillus rhamnosus* suşu GG ve *Lactobacillus plantarum* 299v ile gösterilmiştir. Bu organizmaların her ikisi de, *Escherichia coli*'nin insan kolon hücresine bağlanmasını önleme kabiliyetini göstermiştir.¹²⁴

Bir başka olası etki mekanizması, antimikrobiyal bileşik sentezi yoluyla mikrobiyal floranın yapısının değiştirilmesidir.¹²⁵ Pek çok laktobasilli ve bifidobakteri türü bakteriyosin ve antimikrobiyal bileşikler üretir. Bakteriyosinler "biyolojik olarak aktif protein kısmı içerir ve bakteriler tarafından üretilen bakterisidal etkili bileşikler" olarak tanımlanmaktadır.¹²⁶

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen diğer biyolojik aktif bileşikler arasında hidrojen peroksit, diasetil ve kısa zincirli yağ asitleri bulunur. Bu bileşiklerin probiyotik

organizmalar tarafından salınması, mikrofloranın modifikasyonu ile sonuçlanır.¹²⁷ Bununla birlikte, tüm laktobasil veya bifidobakteri suşları antimikrobiyal bileşikler üretmez ve bu nedenle, patojenik organizmaların yanı sıra faydalı bakteriler de negatif etkilenebilir.¹²⁸

Ayrıca probiyotiklerin immün yanıtı uyarabildiği de gözlenmiştir.¹²⁹ Bu immün yanıt, artan immünoglobulin-A (IgA) salgılanması, yüksek sayıda doğal öldürücü hücre veya makrofajların fagositik özelliklerinin geliştirilmesi şeklinde olabilir.¹³⁰ IgA'nın artan salgılanması bağırsaktaki patojen organizmaların sayısını azaltabilir, böylece mikrofloranın kompozisyonunu iyileştirebilir.¹²³ Bu immüno-modülatör etkilerinden dolayı, bazı araştırmacılar probiyotiklerin sadece bağırsak ve ürogenital patojenlerle savaşmakla kalmayacağını, aynı zamanda enflamatuar bağırsak hastalığı (IBD), poşit, gıda alerjisi gibi durumlar da ve aşılama adjuvanı olarak faydalı olabileceğini düşünmektedirler.^{131, 132}

2.5. Probiyotikler ve pestisitlerin ilişkisi

Geniş toprak alanları, ağır metal (HM'ler) birikintileri ve pestisit spreyleme ile kontamine edilmiştir. Zararlıların kontrolü için uygulanan pestisitlerin % 0.1'inden azı hedef zararlılara ulaşmaktadır. Bu nedenle, kullanılan pestisitlerin % 99.9'dan fazlası, halk sağlığını ve faydalı biyotayı olumsuz etkilemekte, toprağı, suyu ve ekosistemi kirletmektedir. Bu nedenle, bu çevresel kirleticiler vücuda kolayca su ve diyet yoluyla bulaşır, inflamasyon, oksidatif stres ve bağırsak bozukluğu gibi olumsuz etkiler yaratır. Çevreden kaynaklanan kirleticilerin giderilmesi, dünya çapında ciddi bir endişe haline gelmiştir. Pestisitlerin neden olduğu zararlara karşı savaşmak için pahalı ilaçlar geliştirilmiş ve uzun süreli tedaviler uygulanmıştır.¹³³ Bu nedenle böcek ilaçlarının olumsuz etkilerini azaltmak için daha ekonomik alternatifler gerekmektedir. Yeterli miktarda takviye edildiğinde insan sağlığına fayda sağlayan probiyotikler ve canlı

mikroplar, gıda kaynaklı kirleticilere karşı koruma için umut verici bir araç olarak kabul edilmektedir.¹³⁴⁻¹⁴²

Probiyotiklerin; pestisitler, ağır metaller ve aflatoksin gibi çevresel toksinlerin emilimini profilaktik olarak önleme potansiyelini tespit etmek için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bazı pestisitlerin mikrobiyota tarafından üretilen enzimler tarafından metabolize edildiği bilinmektedir. Özellikle laktobasillerin günlük ürünlerde ve buğday da organofosfat pestisit kontaminasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bunun etki mekanizması belirsizliğini korumakla birlikte genellikle bakterinin fosfataz yeteneğine bağlı olduğu ileri sürülmüştür.¹⁴³ Organofosfat insektisit olan klorpirifos, mikrobiyota tarafından biyotransformasyon yoluyla 3,5,6-trikloro-2-piridinol olan daha toksik bir moleküle metabolize edilir, bu da konakçı sağlığı üzerinde biyolojik olarak daha olumsuz sonuçlara yol açar. Oysa bazı bakteri türleri, örn. *Pseudomonas* spp. gastrointestinal sistemde bulunan *L. lactis*, *E. coli* ve *L. fermentum*, tek karbon ve enerji kaynakları olarak 3,5,6-trichloro-2-pyridinol'ü kullanabilmektedir.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Birçok çalışma, probiyotiklerin canlılığını, kolonileşme kabiliyetini ve toksik maddelere bağlanma kapasitesini analiz etmiştir. *Lactobacillus casei* DN114001 suşu, in vitro heterosiklik aromatik aminlere bağlanabilir ve bu aminlerin konsantrasyonunu ve genotoksisitesini azaltabilir.¹⁴⁷ *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 suşu ve *Lactobacillus casei* Shirota suşu ile bifidobakteri suşları aflatoksin B1'e bağlanabilir ve bağırsak sisteminde aflatoksinlerin emilimini önleyebilirler.^{148, 149} *Lactobacillus kefir* suşları, *Clostridium difficile* toksinlerini yüzey katmanı (s katmanı) proteinleri ile bağlayabilmişlerdir.¹⁵⁰

İn vitro, hücre kültürü kullanan ve in vivo hayvanlarda yapılan çalışmalar, probiyotiklerin toksik maddelere bağlanabileceğini ve emilimlerini önleyebileceğini göstermiştir. Örneğin probiyotiklerin koruyucu etkilerini göstermek için yapılan bir

çalışmada, etanolün neden olduğu karaciğer hasarı oluşturulmuş rat modelinde, aflatoksinlerin emiliminin, probiyotikler tarafından azaltıldığı gösterilmiştir.¹⁵¹

Kanıtlar *Lactobacilli*'nin akut ve kronik kadmiyum (Cd) toksisitesini hafifletebildiğini, organizmaları pestisitlerin toksisitesine karşı koruduğunu, antibiyotiklerle ilişkili ishal riskini azalttığını (AAD) ve bağırsak mikrobiyotasını (GM) yeniden dengelediğini göstermiştir.^{152, 153} Bağırsak florasının, bağışıklıklığın düzenlenmesi, metabolizma ve ayrıca çeşitli kirletici maddelerin biyoyararlanımı ve toksisitesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Güçlü kanıtlar bağırsak florasının probiyotikler tarafından değiştirilebileceğini ve çevresel kirleticilerin detoksikasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ *Malathion*'a maruz kalmış farelerde bağırsak mikrobiyom gelişimi etkilenmiştir.¹⁵⁸ *Glyphosate*'ın kanatlı mikrobiyotası üzerindeki etkisi, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'u içeren patojenik bakterilere rezistansın artması ve *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* ve *Lactobacillus spp* gibi yararlı bakterilerin çoğunun da duyarlılıklarının artması ile ispat edilmiştir.¹⁵⁹

Laktobaciller pestisitlere bağlı oksidatif strese ve hücresel hasara karşı koruma sağlar. Birkaç araştırma, endosülfanın indüklediği karaciğer ve böbrekte artan oksidatif stres ve MDA konsantrasyonunun *Laktobacillus plantarum BJ0021* takviyesi ile düşebileceğini göstermiştir.¹⁶⁰ Başka bir çalışma *Laktobacillus casei ATCC334*'ün kanserojen *1,2-dimethylhydrazine* maruz kalan ratlarda DNA hasarını azaltabileceğini göstermiştir.¹⁶¹

Probiyotikler bağırsak bariyerinin bütünlüğünü korur ve pestisitlerin emilimini azaltır.¹⁶² Yapılan bir çalışmada *L. plantarum MB452*'nin Caco-2 bağırsak hücre hattında

okludin, ZO-1, ZO-2 ve cingulin gibi hücreler arası sıkı bağlantıları oluşturan proteinlerin ekspresyonlarını arttırdığı bulunmuştur.¹⁶³

Lactobacilli, pestisitlere karşı koymak için konağın kendi bağışıklık ve detoksifikasyon mekanizmalarını harekete geçirir ve patojen invazyonunu azaltır. Probiotik *L. plantarum ATCC14917*, imidakloprid'e maruz kalmış meyve sineğindeki immüniteyi uyardığını ve patojenik mikroorganizma (*Serratia marcescens*) enfeksiyonlarını azalttığını göstermiştir.¹⁶⁴

Pestisitlerin neden olduğu zararlara karşı savaşmak için pahalı ilaçlar geliştirilmiş ve uzun süreli tedaviler uygulanmıştır.¹³³ Bu nedenle böcek ilaçlarının olumsuz etkilerini azaltmak için daha ekonomik alternatifler gerekmektedir.

Literatürdeki çalışmalar, pestisit intoksikasyonunda probiyotik olarak kullanılan bakterilerin etki mekanizmalarını açıklamaya çalışmıştır ancak mayaların burdaki rolleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında; ratlarda neonikotinoid pestisitler ile oluşturulan kronik toksisite deneyinde; karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin dokusu üzerinde pestisitlerin olası toksik etkilerinin bir probiyotik olan *Saccaromyces Boulardii* ile önlenilmesi amaçlanmıştır.

2.6. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

DNA baz mutasyonları içinde en çok bilinen 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) guanin bazı ile 8.pozisyonda etkileşime girerek oksidasyona neden olur ve DNA'nın oksidatif hasarı sonucunda meydana gelir.¹⁶⁵ DNA da endojen oksidatif hasarın ölçülmesinde etkili bir biyobelirteç olan 8-OHdG karsinogenezin de başlatılmasında ve ilerletilmesinde bir faktördür. İnsanların tütün dumanı, asbest, ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kansere sebep olan maddelere maruz kalmaları sonrasında DNA hasarını belirlemek için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, 8-OHdG

sadece biyobelirteç olarak değil, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkta risk faktörü olarak çalışılmıştır.¹⁶⁶

2.7. Glial Fibriller Asidik Protein

Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP) olgun astrositlerin hücresel iskeletine özgü intrastoplazmik filamentli proteindir ve astrositlerin farklılaşmalarında önemli rol oynar.¹⁶⁷ Omurgalıların merkezi sinir sisteminde travma, genetik bozukluklar veya kimyasal hasar sonucu yaralanma da astrositler reaktif hale gelir ve astrogliosis olarak adlandırılan sürece girerler. Astrogliosis, GFAP'ın hızlı sentezi ile karakterize edilir ve protein içeriğindeki artış veya GFAP antikoru ile immüno-boyama ile gösterilir.¹⁶⁸ Merkezi sinir sistemi hasarlarında, GFAP'ın artışının kritik bir rol oynadığı ve belirgin bir artışın olması, hasar kontrolünde etkili olduğunu gösterir.¹⁶⁹

2.8. Interleukin-6

İlk olarak immüno-globülin geliştiren B hücre uyarıcı faktör 2 olarak tanımlanan Interleukin-6 (IL-6), aktive edilmiş B hücreleri tarafından sentez edilen, pleotropik prototipik bir sitokindir. IL-6, inflamasyonda önemli bir mediyatördür. IL-6 akut olarak enfekte olmuş veya hasar görmüş bir lezyonda üretilir ve tüm vücuda acil bir sinyal yollar.¹⁷⁰

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışma, Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM), Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı ve Girit Üniversitesi Tıp Fakültesi Toksikoloji ve Adli Bilimler Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışma Atatürk Üniversitesi'ne ait Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) laboratuvarından alınan 200-300 gr arasında olan 72 adet Wistar Albino cinsi erkek rat ile yapıldı. Ratların su alımları (ad libitum) ve yem alımları (pellet) serbest bırakıldı. Deneye başlanmadan önce ratlar 1 hafta normal oda sıcaklığında (22⁰C) ortama uyum sağlamaları için gruplara ayrılarak kafeslerde bekletildi. Çalışmamızın etik kurul izni 'Atatürk Üniversitesi bünyesinde yer alan Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'dan 30.11.2017 tarih ve 42190979-000-E.1700332023 sayılı belge ile onaylandı.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Hazırlanışları

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan ilaçlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kronik toksisite oluşturmada ve toksisitede ki etkilerinin araştırılacağı ticari ürünler

Kullanılan Madde	Menşei
Reflor (S. boulardii)	Sanofi
Gortca (İmidacloprid)	Safa Tarım A.Ş. Türkiye
Mosetam (Acetamipirid)	Safa Tarım A.Ş. Türkiye

Reflor: Çözücü olarak steril su kullanıldı. 1ml'sinde 1×10^9 CFU/gün mantar olacak şekilde hazırlanıp, oral gavaj youyla ratların ağırlığına göre hesaplanarak 90 gün boyunca verildi.

Gortca: Çözücü olarak musluk suyu kullanıldı. 1ml'sinde 5.7 mg/kg madde olacak şekilde hazırlanıp, oral gavaj youyla ratların ağırlığına göre hesaplanarak 90 gün boyunca verildi. Doz için referans 'U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Imidacloprid; Pesticide Tolerance and Raw Agricultural commodities. 40 CFR Part 180 Section 472' tanımlanan NOAEL olarak belirlenmiştir.

Mosetam: Çözücü olarak musluk suyu kullanıldı. 1ml'sinde 12.4 mg/kg madde olacak şekilde hazırlanıp, oral gavaj youyla ratların ağırlığına göre hesaplanarak 90 gün boyunca verildi. Doz için referans 'European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General Directorate e – food safety: plant health, animal health and welfare, international questions e1 - plant health' tanımlanan NOAEL olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan alet ve cihazlar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Kullanılan Alet ve Cihazlar	Menşei
Ayarlanabilir otomatik pipetler	Eppendorf
Buzdolabı (+4°C)	Altus AL 365
Derin dondurucu (-20 °C)	Vestel BZP-XL 3402 W
Elektronik hassas terazi	Shimadzu ATX 224
Santrifüj	Electro-mag

3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan sarf malzemeler Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Deneyde kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan Sarf Malzemeler	Menşei
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
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
Pipet ucu (0,1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Pipet ucu (0,5-10µL;2-20µL;20-200µL;100-1000µL)	Nest
Ultra-0,5 Serolojik pipet (10 mL; 50 mL)	Greiner bio-one
Finisterre SPE Columns C18/17 %	Teknokroma
Sustain Swift C18 5µm 250x4.6	Gl. Sciences
Ultra Vitalux 300w 230V E27	Osram

3.2. Metod

3.2.1. Deney Planı

Çalışma 5 deney grubu ve 1 kontrol grubu olmak üzere 6 gruptan oluşturuldu. Her grupta 12 adet rat olmak üzere 72 adet erkek rat kullanıldı. Deneye başlamadan önce tüm hayvanlar tartılarak ağırlıkları kaydedildi. 90 gün boyunca gruplara ayrılan hayvanlara IMI, ACE ve S.Boulardii oral yoldan verildi. Çalışma kapsamında kullanılan hayvan sayıları Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışma için tasarlanan deney grupları ve gruplara göre hayvan sayıları

Deney Grupları	Her grupta bulunan hayvan sayısı
Kontrol Grubu	12
Probiyotik Grubu (PRO)	12
Acetamidrid Grubu (ACE)	12
Acetamidrid + Probiyotik Grubu (ACE+PRO)	12
Imidacloprid Grubu (IMI)	12
Imidacloprid+ Probiyotik Grubu (IMI+PRO)	12
Toplam	72

Grup I) Kontrol: Hiçbir girişimde bulunulmadı, serbest yem ve alımları sağlandı.

Grup II) Probiyotik: 1×10^9 CFU S.Boulardii oral gavaj yolu ile 90 gün boyunca her gün aynı saatte verildi.

Grup III) Acetamidrid: 12.4 mg/kg acetamidrid oral gavaj yolu ile 90 gün boyunca her gün her gün aynı saatte verildi.

Grup IV) Acetamidrid + Probiyotik: 12.4 mg/kg acetamidrid ve 1×10^9 CFU S.Boulardii oral gavaj yolu ile 90 gün boyunca her gün aynı saatte verildi.

Grup V) Imidacloprid: 5.7 mg/kg imidacloprid oral gavaj yolu ile 90 gün boyunca her gün aynı saatte verildi.

Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: 5.7 mg/kg ve 1×10^9 CFU S.Boulardii oral gavaj yolu ile her gün olacak şekilde 90 gün boyunca verildi.

Deney sonunda ratlar sevofluran anestezisi ile öldürülerek; beyin, karaciğer, böbrekler, ince bağırsak dokuları ve kanları alındı. Ratların dokularının yarısı %10'luk formaldehit içine konularak patolojik incelemeye, diğer yarısı kalıntı analizi için -30°C de muhafaza edildi.

3.2.2. Ağırlık Ölçümü

Deneye başlanmadan önce bütün ratlar tartılarak her kafese 4 adet olacak şekilde yerleştirildiler ve her hafta pazar günü tekrar tartılarak haftalık doz ayarlamaları yapıldı.

Toplam 13 hafta boyunca bütün ratların ağırlıkları kayıt altına alındı.

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

Alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), alkalin fosfataz (ALP), Laktik asit dehidrogenaz (LDH), ve üre için serum enzim aktiviteleri ve hematolojik parametreler bir biyokimya otoanalizörü (Cobas 6000 / Roche Diagnostics, Almanya) üzerinde ticari olarak temin edilebilen test kitleri (OSR6121 ve OSR60117) kullanılarak belirlenmiştir. Analizler için Buhara Hastanesi Laboratuvarlarından hizmet alımı yapılmıştır.

3.2.4. Patolojik Analizler

3.2.4.1. Histopatolojik İnceleme

Deney sonrasında yapılan nekropsi sonucu doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonuna alındı. 48 saat tespit edildikten sonra, akan çeşme suyunda 10 dakika yıkandı. Rutin doku takibi yapıldıktan sonra parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi. Kesitler histopatolojik bulgulara göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.2.4.2. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunperoksidaz inceleme amacıyla adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Daha sonra distile suda 5 dk yıkandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH 7.2) ile 5dk yıkandı, % 3'lük H₂O₂ de 10 dk tutuldu, endojen peroksidaz inaktive edildi. PBS de 5-10 dk yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan Protein blok ile 5 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkanma yapılmadan primer antikorlar (GFAP, 8 OHdG, IL-6) ve kontrol grubunda PBS

damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece +4°C'de bekletildi. PBS ile 2 kez 5'er dk yıkandı, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkube edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz da 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere 3-3' Diaminobenzidine (DAB) kromojen, damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Zemin boyanması için Mayer's hematoksilen de 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek lamelle kapatılıp ve ışık mikroskobu (Leica DM 1000) ile incelendi. Kesitler immün pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.2.5. Kalıntı Analizleri

3.2.5.1. Spike örnekler ve standart solüsyonların hazırlanması

İmidakloprid ve acetamiprid'in stok (1 mg / ml) ve çalışma solüsyonları (0, 50, 100, 250 ve 500 ng / ml) metanol içinde hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Dokular (karaciğer ve böbrek) kontrol grubu hayvanlarından kullanıldı ve spike eğrilerinin (0, 0.1, 0.25, 0.5 ve 2 µg / g) oluşturulması için blank olarak kullanıldı.

3.2.5.2. Doku numunelerinin ekstraksiyon prosedürü

0.5 gr dokuya, 1.5 ml nanopure su ve 0.1 µg ethirimol (internal standart) ilave edildi. Dokular mekanik olarak homojenize edildi, ve 2 mL diklorometan eklendikten sonra karışım 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra karışım 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve diklorometan tabakası ayrıldı. Su katmanına 10 µL HCl 6M eklendi ve 2 ml diklorometan ilave edilerek ekstraksiyon prosedürü tekrarlandı. Birleştirilen organik fazlar, azot altında kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kalıntı, 100 µL metanolde sulandırıldı ve Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LCMS) analizi için kullanıldı.

3.2.5.3. Sıvı kromatografi ve kütle spektrometresi enstrümantasyonu

Analitlerin belirlenmesi ve nicelleştirilmesi için bir ikili sıvı kromatografi (LC)

pompası, bir vakum gazı, bir otomatik örnekleyici ve bir sütun fırınından oluşan bir sıvı kromatografi kütle spektrometre sistemi (Shimadzu, Kyoto Japonya) kullanılmıştır. Mobil faz, su (çözücü A) ve metanol (çözücü B) içindeki % 0.1 formik asit, % 20 çözücü B, % 50 (5.0 dakika linear ramp), % 80 (3.0 dakika linear ramp) ve son olarak % 100 B (6.0 dakika linear ramp), akış hızı 0.6 ml / dak olacak şekilde başlatıldı. Kolon, 30 °C'de bir Discovery C18 tipinde (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) idi. Analiz, pozitif modda bir atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) arayüzü kullanılarak tek bir dört kutuplu kütle filtresi ile gerçekleştirildi. Arayüz, kavisli çözünme sistemi, ısı bloğu sıcaklıkları, dedektör voltajı, nebulize edici gaz akışı ve kurutma gazı sırasıyla 400°C, 200°C ve 200°C, 1.5 kV, 2.5 L / dak ve 0.02 MPa olarak ayarlanmıştır.

İzleme iyonları, IMI için 256.10, 211.85, 174.95, ACE için 223.05, 255.1, 198.9, ethirimol için 210.10, 182.05, 206.05 iken alıkonma süreleri sırasıyla IMI, ACE, ve ethirimol için 10.56, 11.23, ve 11.70 dakika idi.

3.2.6. Genotoksik Analiz (Comet Testi)

Çalışma kapsamında Comet testi için kullanılan çözeltiler Tablo 3.5.'de verilmiştir.

Tablo 3.5. DNA kuyruk yoğunluk analizi için kullanılan genotoksik analiz (COMET) için kullanılan çözeltiler

COMET için kullanılan çözeltiler	
Low Melting Agaroz (LMA) çözeltisi (%0,65) LMA 32.5 mg PBS (1X) 5 MI Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlandı	NaOH çözeltisi (10 M) NaOH 200 g Steril su 500 mL'ye tamamlandı
Normal Melting Agaroz (NMA) çözeltisi (%0.65) NMA 0.65 g Steril su 100 MI Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlandı	EDTA çözeltisi (0.2 M) EDTA 37.2 g Steril su 500 mL'ye tamamlandı + 4 C° saklandı
Lizis stok çözeltisi NaCl 146.1 g EDTA 37.2 g Trisma baz 1.2 g Steril su 1000 mL'ye tamamlandı	Lizis çözeltisi Lizis stok çözeltisi 89 MI DMSO 10 MI Triton-X 100 1 MI Çözelti taze olarak hazırlandı

Tablo 3.5. (Devamı)

COMET için kullanılan çözeltiler	
Nötralizasyon tamponu (0,4 M)	Elektroforez tamponu
Trisma baz 24.25 g	10 M NaOH 30 MI
Steril su 500 mL'ye tamamlandı	0,2 M EDTA 5.4 MI
10 N HCl ile pH 7.5'e ayarlandı	Steril su ile 1000 mL ye tamamlandı
EtBr stok çözeltisi (%0.01)	EtBr çözeltisi (%0.002)
EtBr 5 mg	EtBr stok çözeltisi 100 MI
Steril su 50 mL'ye tamamlandı	Steril su 400 µL ye tamamlandı

10 M NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlandı ve +4 °C de saklandı. Kimyasalların tartımı yapıp 900 ml distile su içerisinde çözüldü (pH 12 olana kadar 10M NaOH ilave edilir ve yaklaşık 8.5 olana kadar beklendi). Daha sonra pH 10 olana kadar NaOH ilave edilmeye devam edildi. Çözeltinin hacmi distile su ile 1000 ml ye tamamlandı.

Lamların hazırlanması için pozitif yüklü lamlar 50 mL'lik falkon içerisinde hazırlanan ve yaklaşık 40 °C sıcaklıkta olan NMA çözeltisine daldırıldı. Agarozun fazlası rodajlı kısımdan tutularak temizlenen lamlar oda sıcaklığında bir gece agarozun donması için bırakıldı. Deney hayvanlarından alınan 100 mikrolitre kana 1 ml PBS (+4 °C) eklenir, karıştırılır ve buz üzerinde 15 dakika bekletilir. 100 mikrolitre Histopaque 1077 veya (Lymphoprep) tüpün dibine eklenir. 200xg (1060 rpm) +4 °C'de 3 dakika santrifüj edilir. Pembe kısmın üstündeki tabakada yer alan lenfositlerden 100 mikrolitre alındı ve 37 °C'deki 100 mikrolitre LMA ile karıştırılarak lama yayılır ve lamel ile kapatılarak +4 °C'de agar katılaşmaya kadar beklendi. Agaroz donduktan sonra lameller dikkatlice kaldırıldı. Lamlar hücre ve çekirdek membranı eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla taze hazırlanan lizis çözeltisi içinde +4 °C, karanlıkta bir gece bekletildi. Çalışmanın bundan sonraki aşaması karanlık ortamda gerçekleştirildi. Lizis aşamasını takiben lamlar taze hazırlanmış ve +4 °C'de soğutulmuş elektroforez tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. DNA sarmalının açılması için elektroforez uygulamasından önce lamlar tampon içinde 20 dk süre ile bekletildi. Daha sonra, güç kaynağı yardımıyla 20 volt ve 300 mA akımda 20 dk süre ile, elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez sonunda lamlar nötralizasyon tamponu içeren şaleye

dizilerek +4 °C’de 3 kez 5 dk süre ile bekletildi. Deneyler, her konsantrasyon için en az 2 tekrar ve aynı koşullarda farklı 3 günde çalışmak üzere toplam en az 6 tekrar olacak şekilde yapıldı. Negatif kontrol olarak maruziyet olmamış benzer şekilde analize hazırlandı. Pozitif kontrol (PK) olarak 100 µM hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmış olup deneyde hücreler 3 saat süre ile pozitif kontrole tabi tutuldu.

Her bir lam üzerine 100 µL taze Etidyum Bromür çözeltisi yayılarak lamel ile kapatıldı. Floresan mikroskopta 40x10 büyütme ile görüntülemenin ardından sayım yapılarak DNA hasarının tespiti değerlendirildi. Her lamda farklı bölgelerden olmak üzere 100-200 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerde DNA hasar tespitinin değerlendirilmesi comet görüntü işleme ve analiz programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK) ile gerçekleştirildi. DNA hasarının derecelendirilmesinde kuyruktaki DNA yoğunluk yüzdesi (tail intensity) kullanıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz Değerlendirmeleri

Çalışmamızın verilerini IBM 18.00 SPSS paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak analiz edildi. Verilerin homojen dağılıp dağılmadığı kontrol edildikten sonra varyansların homojenliği değerlendirildi. Levene testinde is $p > 0.05$ değeri olan grupların varyansları homojen olarak kabul edildi. Veri dağılımı normal olmayan ve varyansları homojen olmayan gruplara non-parametrik test olan Kruskal Wallis, normal olan gruplara ise parametrik test olan Oneway Anova testi yapıldı. Varyansları homojen olan gruplara post hoc Duncan ve varyansları homojen olan gruplara post hoc Dunnet testi yapıldı. Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Haftalara ve Gruplara Göre Ratların Ağırlık Ölçümleri

Deney hayvanları 13 hafta boyunca her hafta pazar günleri olacak şekilde Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde Tess marka elektronik tartı ile tartıldı ve düzenli bir şekilde kayıtlar tutuldu. Çalışma kapsamında tartılan ağırlıkların ortalama ve standart sapmaları Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Gruplar 13 haftalık ağırlık ölçüm sonuçları

Hafta	Kontrol	IMI	ACE	PRO	IMI+PRO	ACE+PRO
1	190.63±63.93	192.61±4.67	198.45±28.34	195.25±32.11	195.83±3.63	191.18±6.66
2	250±65.48	254.53±5.91	247.72±35.56	255.91±37.73	254.83±10.62	250.18±7.64
3	283.45±64.24	290.69±7.19	280.54±36.80	282.50±32.52	282.16±20.94	287.72±9.15
4	313.81±67.97	319.76± 8.85	302±48.53	318.08±38.18	302.75±24.33	307.27±11.67
5	330.72±64.44	340.07± 10.04	332±36.62	339.91±36.67	319.41±25.64	328.90±12.13
6	360.45±69.04	362.84±10.69	357.36±33.67	366.08±39.76	344.33±30.07	351.72±12.43
7	378.27±69.66	376.07±11.65	357.36±33.67	380.66±40.50	359.83±34.10	370.18±11.47
8	379.36±64.81	395.69±11.84	396.63±38.15	391.75±32.65	379.33±37.88	392.63±11.22
9	400.81±67.56	417.30±11.96	416.18±41.80	422.83±41.25	397.66±40.34	405.09±16.37
10	402±64.84	420.84±12.24	421.36±41.75	428.33±41.57	398.83±40.56	416.45±12.70
11	415.63±58.11	428.84±12.46	422.09±42.70	429.58±37.04	417.58±46.04	429.09±11.67
12	400.81±67.56	417.38±11.94	416.18±41.80	422.83±41.25	397.66±40.34	414.18±12.12
13	431.18±59.56	450.76±12.88	449.45±45.31	453.75±53.46	439.25±48.19	448.72±11.88

Değerler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA testinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Tukey'e göre yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi. Test edilen bütün gruplarda anlamlılık düzeyi P>0.05 olarak tespit edilmiştir.

Deney gruplarında haftalara bağlı ağırlık artışları değerlendirildiğinde grup içlerinde haftalar bazında lineer bir artış olduğu görülmüştür ama kontrol grubuna göre diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bütün gruplarda 11. hafta ile 12. haftaya geçişte kilo kaybı bulunduğu ancak anlamlı bir değişim olmadığını ve bu kaybın 13. haftada geri kazanıldığı görülmektedir.

4.2. Biyokimyasal Ölçüm Sonuçları

Çalışmada, probiyotiklerin IMI ve ACE ile oluşturulan kronik toksisite modelindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla ratların kalplerinden alınan kanda biyokimyasal ve hematolojik parametreler incelendi ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’da verildi.

Tablo 4.2. Deney ve kontrol grubu ratların kan ALT, AST ve ALP değerleri

Doz grupları	Zaman (gün)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)
Kontrol	90	62.6±12.87	189.1±36.17	112.8±20.49
IMI	90	64.5±8.93	196.5±23.27	186.2±19.09
ACE	90	70.1±11.68	194.3±14.67	172.2±20.39
PRO	90	76± 10.95	250±61.84	179.1±20.40
IMI+PRO	90	71.1± 8.93	205.6±50.01	185.4±22.33
ACE+PRO	90	68.3± 10.59	192.8±2.22	166.8±14.02

Değerler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA testinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Tukey’e göre yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi. Test edilen bütün gruplarda anlamlılık düzeyi P>0.05 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. Deney ve kontrol grubu ratların kan LDH ve üre değerleri

Doz grupları	Zaman (gün)	LDH (IU/L)	ÜRE (mg/dL)
Kontrol	90	1758.8±227.41	40.7±2.50
IMI	90	2423.5±216.54	42.7±2.54
ACE	90	2350.7±191.46	38.6±2.45
PRO	90	2577.8±171.15	39.1±2.21
IMI+PRO	90	2031.4±276.98	40.6±1.44
ACE+PRO	90	1432.4±127.06	40.7±4.40

Değerler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA testinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Tukey’e göre yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi. Test edilen bütün gruplarda anlamlılık düzeyi P>0.05 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. Deney ve kontrol grubu ratların hemogram değerleri

	Kontrol	IMI	ACE	PRO	IMI +PRO	ACE+PRO
WBC (10 ³ /µl)	6.28±1.24	7.43±2.88	12.05±7.51	5.91±4.62	6.23±1.07	13.82±9.90
Nötrofil	1.79±0.49	1.24±0.54	1.73±1.20	1.12±0.69	1.07±0.05	1.51±0.39
Lenfosit	4.24±0.92	5.92±2.36	9.73±5.96	4.43±3.61	4.74±1.00	11.87±9.46
Monosit	0.09±0.06	0.11±0.04	0.07±0.00	0.09±0.09	0.08±0.05	0.14±0.07
Eozinofil	0.13±0.09	0.15±0.06	0.50±0.35	0.25±0.34	0.32±0.18	0.27±0.08
Bazofil	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
RBC (10 ⁶ /µl)	8.18±0.48	8.92±1.03	9.23±0.34	9.05±0.30	9.21±0.52	8.71±0.62
HGB (gm/dl)	14.63±1.04	15.47±1.71	16.30±0.42	16.17±0.47	16.50±0.98	15.45±0.99
HCT (%)	47.68±3.22	50.67±5.62	51.45±0.63	51.77±2.19	52.52±3.16	49.40±2.51
PLT (10 ³ /µl)	732.50±93.22	543.37± 321.53	740.50± 17.67	866.75± 49.77	702.50± 140.14	761±83.76
MCV (fL)	58.21±0.95	56.83±0.95	55.70±1.41	57.30±4.36	56.97±0.33	56.85±2.59
MCH (pg)	17.83±0.28	17.36±0.42	17.65±0.21	17.87±0.47	17.90±0.37	17.72±0.36
MCHC (g/dL)	30.66±0.33	30.53±0.46	31.70±0.42	31.32±2.03	31.42±0.58	31.25±0.96
IG (g/L)	0.17±0.40	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.03±0.02

Değerler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA testinde Post Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Tukey'e göre yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi. Test edilen bütün gruplarda anlamlılık düzeyi P>0.05 olarak tespit edilmiştir.

Deney gruplarımızda biyokimyasal ve hematolojik parametreler kontrol grubu ile göre diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermemiştir. ALP düzeyleri kontrole göre tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile bir artış göstermiştir. Hiçbir parametre kontrol grubuna göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.3. Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektrometresi Sonuçları (LCMS)

IMI, ACE ve IMI'nin metaboliti olan 6-CNA seviyeleri, karaciğer ve böbrek dokularında 3 ay sonunda deney sonlandırıldıktan sonra ölçülmüştür. Sonuçlar karaciğer dokusu için Tablo 4.8, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de, böbrek dokusu için Tablo 4.9, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 de özetlenmiştir.

Tablo 4.5. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi

(LC-MS) atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon özellikleri (Rt: Alıkonma zamanı, m/z: Kütle/yük, Mw: Molekül ağırlığı)

Tam isim	Kısaltma	Rt (min)	m/z	Q1	Q2	Mw
Desnitro-imidacloprid	DNIH		211,05	213		210,66
hidroklorid						
Imidacloprid	IMI	10,56	256,1	211,85	174,95	255,66
Acetamiprid	ACE	11,23	223,05	255,1	198,9	222,68
Ethirimol	IS	11,7	210,1	182,05	206,05	210,1
6-chloronicotinic acid	6-CAN	11,76	157,85	189,9	96	156,99

4.3.1. Karaciğer Dokusu Kalıntı Analizi

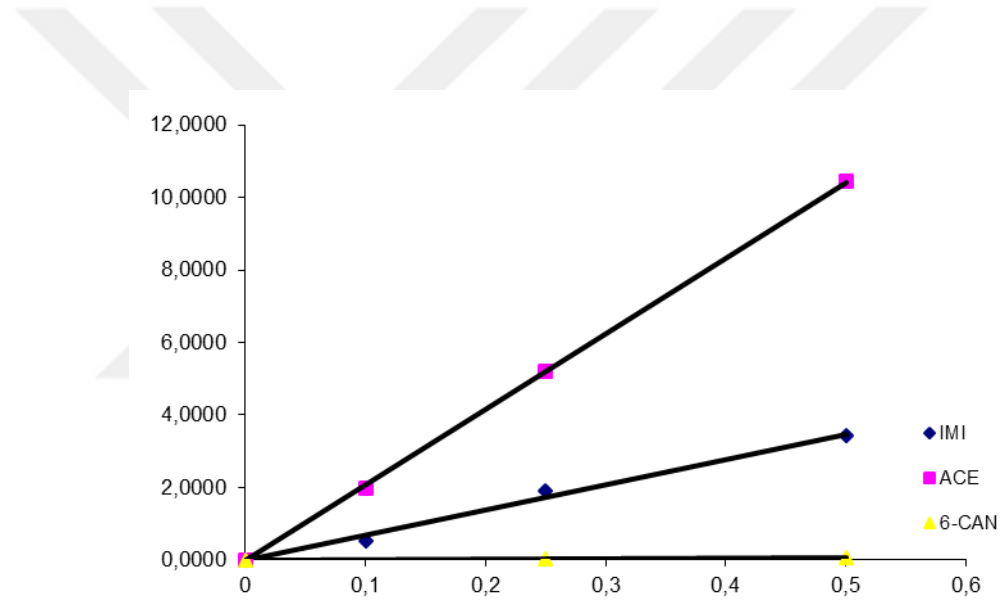
Karaciğer dokusu için referans konsantrasyonlardaki ölçüm sonuçları ve dokuda ki ölçüm sonuçları Tablo 4.8, Şekil 4.2. ve Şekil 4.3 de verilmiştir. Probiyotik grubundaki tüm ölçülen seviyeler algılama sınırının (LOD: Limit of Detection) altında olduğu için ölçüm yapılamadı. IMI ve ACE'nin 6-CNA metaboliti, LOD sınırlamaları nedeniyle hiçbir dokuda ölçülemedi. Karaciğer dokusunda imidacloprid kalıntısı imidacloprid+probiyotik grupta imidacloprid grubuna göre daha az bulunurken ACE kalıntısı da ACE+PRO grubunda ACE grubuna göre daha az bulunmuştur.

Tablo 4.6. Karaciğer dokusu için 0, 0.1, 0.25 ve 0.5 µg/g standart madde yüklenmiş örnekler (spiked) ve analiz sonuçları

Spiked (karaciğer)								
C(µg/g)	IMI	ACE	6-CNA	IS	C(µg/g)	IMI	ACE	6-CNA
0	0	0	0	1316886	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.1	966566	3662530		1855684	0.1	0.5209	1.9737	
0.25	3313100	8941402	49244	1722450	0.25	1.9235	5.1911	0.0286
0.5	7054966	21511724	112614	2060620	0.5	3.4237	10.4394	0.0547

Tablo 4.7. Karaciğer matriksinde imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi ve R-kare değeri

Karaciğer matriksi		
Aktif madde	Doğru denklemi	R ²
İmidacloprid	$y = 6,9607x$	0.9905
Acetamiprid	$y = 20,821x$	0.9998
6-chloronicotinic acid	$y = 0,1103x$	0.9991

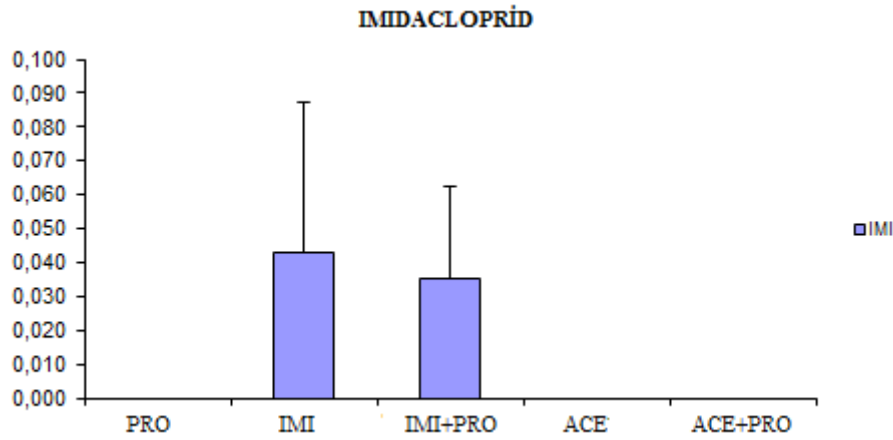


Şekil 4.1. Karaciğer dokusunda imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için elde edilen kalibrasyon eğrisi

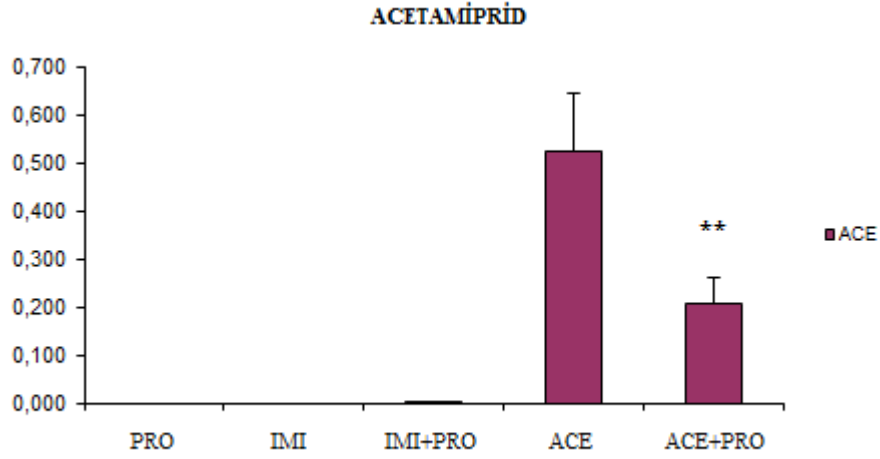
Tablo 4.8. Deney gruplarının karaciğer doku örneklerinde ölçülen imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid düzeyleri

C($\mu\text{g/g}$)	PRO	IMI	IMI+PRO	ACE	ACE+PRO
IMI- S1	0	0.038	0.074	0	0
IMI- S2	0	0.107	0.014	0	0
IMI- S3	0	0.021	0.036	0	0
IMI- S4	0	0.008	0.017	0	0
ACE-S1	0	0	0	0.559	0.171
ACE-S2	0	0	0	0.49	0.249
ACE-S3	0	0	0	0.37	0.15
ACE-S4	0	0	0	0.667	0.258
6-CNA-S1	0	0	0	0	0
6-CNA-S2	0	0	0	0	0
6-CNA-S3	0	0	0	0	0
6-CNA-S4	0	0	0	0	0
Ortalama	0	0.0435	0.0353	0.5215	0.2070
Standart sapma	0	0.0440	0.0276	0.1245	0.0545

Değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği Independent Sample T-test'e göre yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.2. Deney grupları karaciğer doku örneklerinde imidacloprid ve acetamiprid için elde edilen kalıntı düzeyleri



(** $p < 0.005$ ACE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini ifade ediyor)

Şekil 4.3. Deney grupları karaciğer doku örneklerinde acetamidrid için elde edilen kalıntı düzeyleri

Deney grupları IMI grubu IMI+PRO grubu ile karşılaştırıldığında probiyotik verilmiş grup da kalıntı düzeylerinin azaldığı ama istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.762$). ACE grubu ile ACE+PRO grubu kalıntı düzeyleri açısından karşılaştırıldığında ACE+PRO grubunda kalıntı düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşme saptandı ($p= 0.004$).

4.3.2. Böbrek Dokusu Kalıntı Analizi

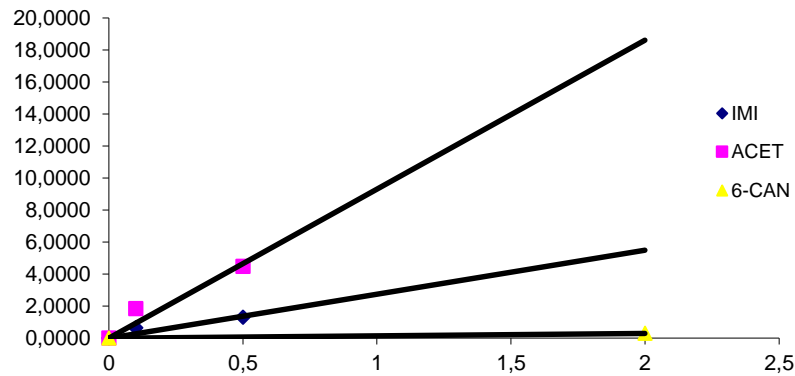
Böbrek dokusu için referans konsantrasyonlardaki ölçüm sonuçları ve dokuda ki ölçüm sonuçları Tablo 4.11, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 da verilmiştir. Probiyotik grubundaki tüm ölçülen seviyeler algılama sınırının (LOD: Limit of Detection) altındaydı. IMI ve ACE'nin 6-CNA metaboliti, LOD sınırlamaları nedeniyle hiçbir dokuda ölçülemedi. Böbrek dokusunda imidacloprid kalıntısı imidacloprid grubunda imidacloprid+probiyotik gruba göre daha fazla bulunurken ACE kalıntısı da ACE grubunda ACE+PRO grubuna göre daha fazla bulunmuştur.

Tablo 4.9. Böbrek dokusu için 0, 0.1, 0.5 ve 2 µg/g standart madde yüklenmiş örnekler (spiked) ve analiz sonuçları

Spiked (böbrek)								
C(µg/g)	IMI	ACE	6-CNA	IS	C(µg/g)	IMI	ACE	6-CNA
0	0	0	0	2112656	0	0.0000	0.0000	0.0000
0.1	897146	2589570		1412006	0.1	0.6354	1.8340	
0.5	3774482	12960956		2896394	0.5	1.3032	4.4749	
2	1244160	38530754	228164	767646	2			0.2972

Tablo 4.10. Böbrek matriksinde imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için kalibrasyon eğrisi denklemi eğimi ve R-kare değeri

Böbrek matriksi		
Aktif madde	Doğru denklemi	R ²
İmidacloprid	$y = 2.7505x$	0.841
Acetamiprid	$y = 9.3109x$	0.9162
6-chloronicotinic acid	$y = 0.1486x$	1

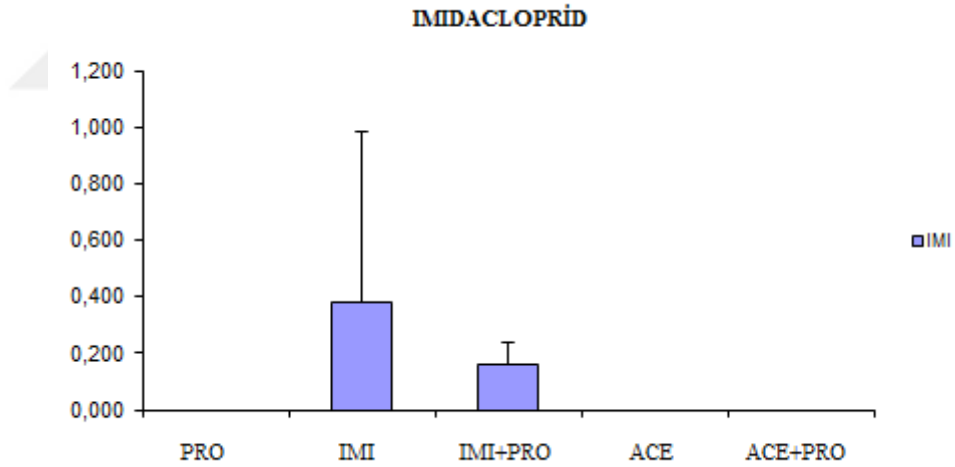


Şekil 4.4. Böbrek dokusunda imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid için elde edilen kalibrasyon eğrisi

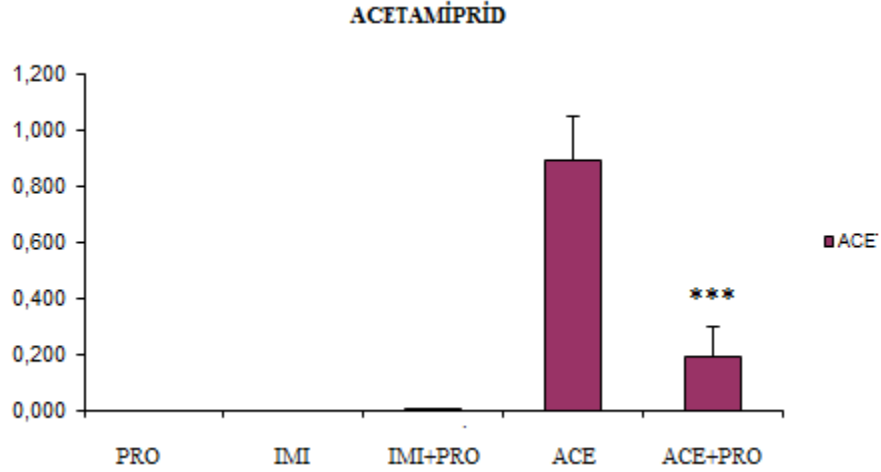
Tablo 4.11. Deney gruplarının böbrek doku örneklerinde ölçülen imidacloprid, acetamiprid ve 6-chloronicotinic acid düzeyleri

C($\mu\text{g/g}$)	PRO	IMI	IMI+PRO	ACE	ACE+PRO
IMI-1	0	0.074	0.212	0	0
IMI-2	0	1.288	0.055	0	0
IMI-3	0	0.113	0.220	0	0
IMI-4	0	0.048	0.164	0	0
ACE-1	0	0	0	0.820	0.069
ACE-2	0	0	0	0.723	0.313
ACE-3	0	0	0	1.089	0.230
ACE-4	0	0	0	0.932	0.157
6-CNA-1	0	0	0	0	0
6-CNA-2	0	0	0	0	0
6-CNA-3	0	0	0	0	0
6-CNA-4	0	0	0	0	0
Ortalama	0	0.3808	0.1628	0.8910	0.1923
Standart sapma	0	0.6054	0.0759	0.1572	0.1039

Değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği Independent Sample T-test'e göre yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.5. Deney grupları böbrek doku örneklerinde imidacloprid için elde edilen kalıntı düzeyleri



(*** p<0.001 ACE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık düzeyini ifade ediyor)

Şekil 4.6. Deney grupları böbrek doku örneklerinde acetamiprid için elde edilen kalıntı düzeyleri

IMI ve ACE grubu sırasıyla IMI+PRO ve ACE+PRO grupları ile karşılaştırıldığında IMI+PRO grubunda kalıntı düzeylerinin azaldığını ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik (p=0.525). Diğer taraftan da ACE+PRO grubunda kalıntı düzeyinin azaldığını ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p=0.000).

4.4. Patoloji Sonuçları

4.4.1. Histopatolojik Bulgular

Grup I) Kontrol: Beyin dokularının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7).

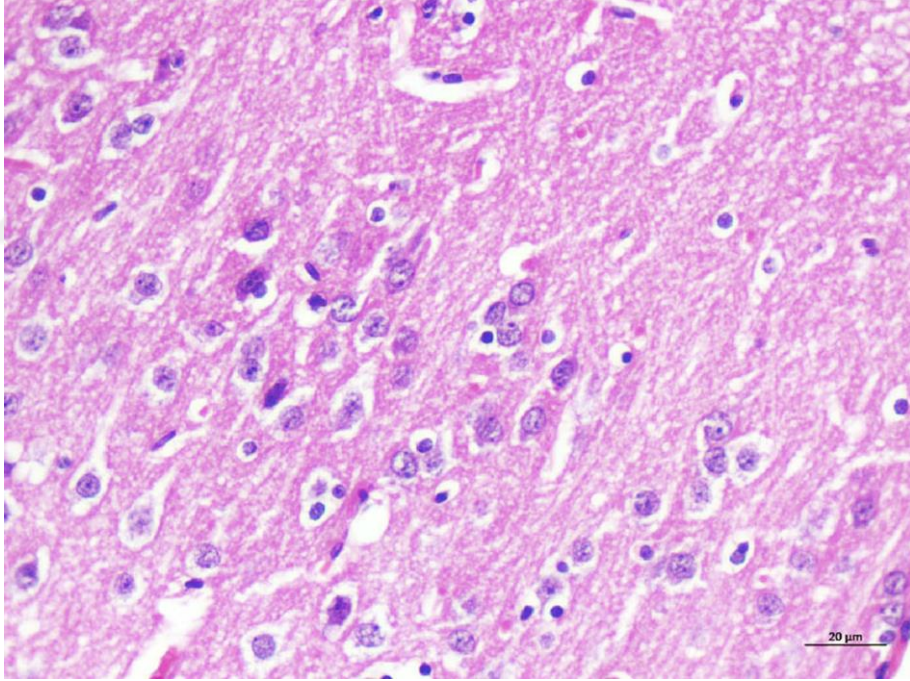
Grup II) Probiyotik: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, meninkslerin ve beyin paransiminin normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 4.8).

Grup III) Acetamiprid: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, meninkslerde hiperemi, beyinde nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve hafif düzeyde nekroz gözlemlendi (Şekil 4.9).

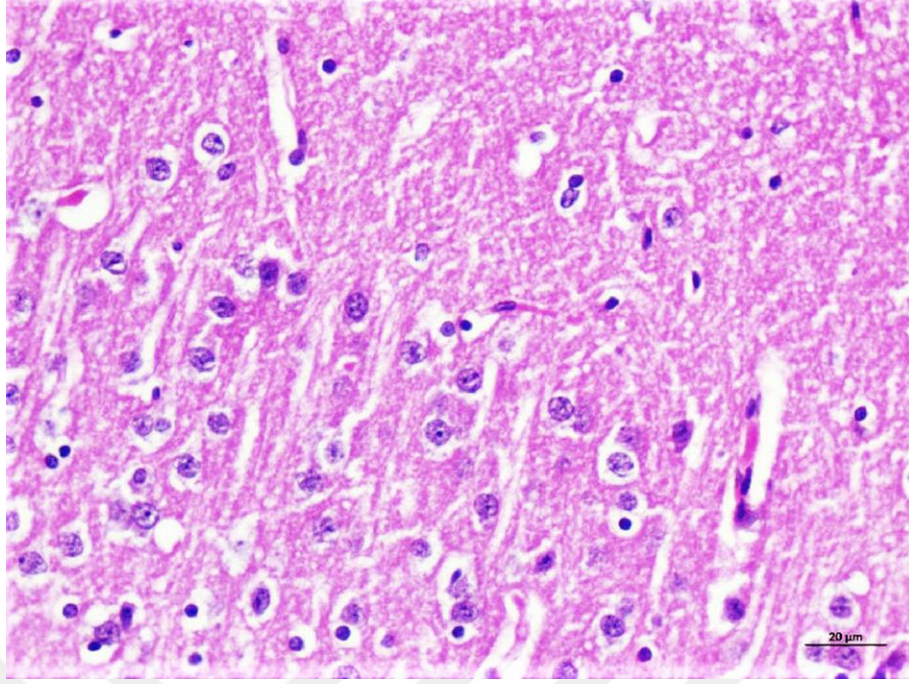
Grup IV) Acetamiprid + Probiyotik: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, menikslerde ve paransim damarlarda orta düzeyde hiperemi, nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon gözlenirken nekrotik hücreye hiç rastlanmadı (Şekil 4.10).

Grup V) Imidacloprid: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve orta şiddette nekroz, meningeal ve pranşimal damarlanlarda şiddetli düzeyde hiperemi gözlendi (Şekil 4.11).

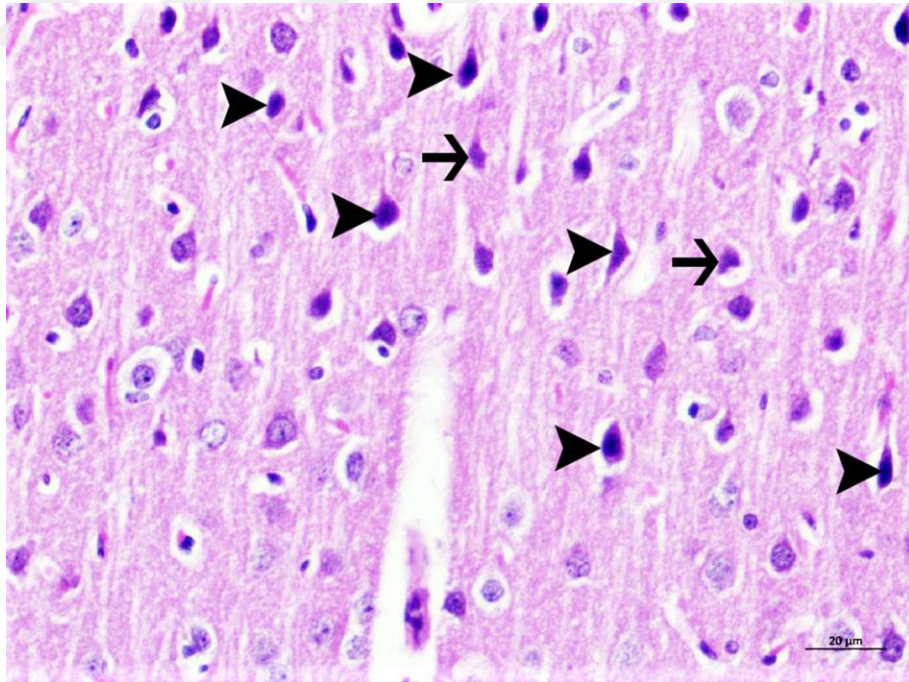
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Beyin dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, nöronlarda hafif dejenerasyon ve damarlarda hiperemi tespit edildi (Şekil 4.12). Histopatolojik bulgular Tablo 4.12 de özetlenmiştir.



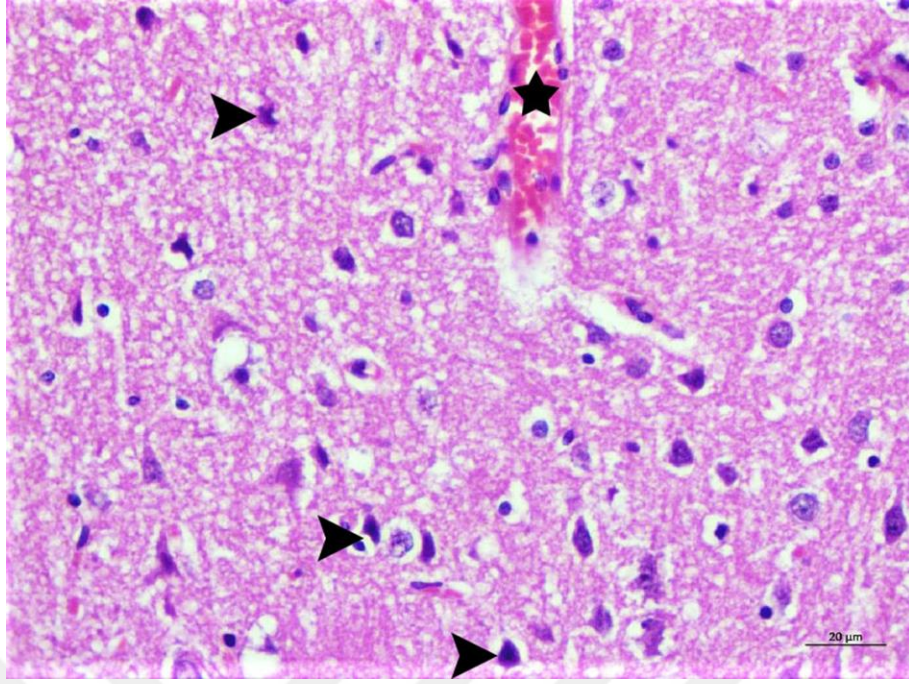
Şekil 4.7. Beyin dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



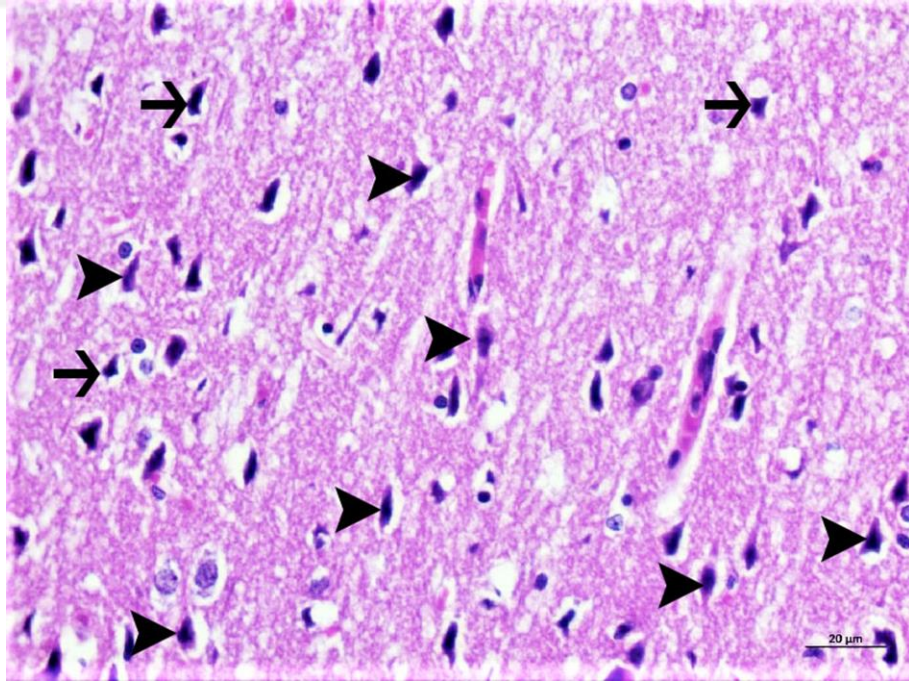
Şekil 4.8. Beyin dokusu PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



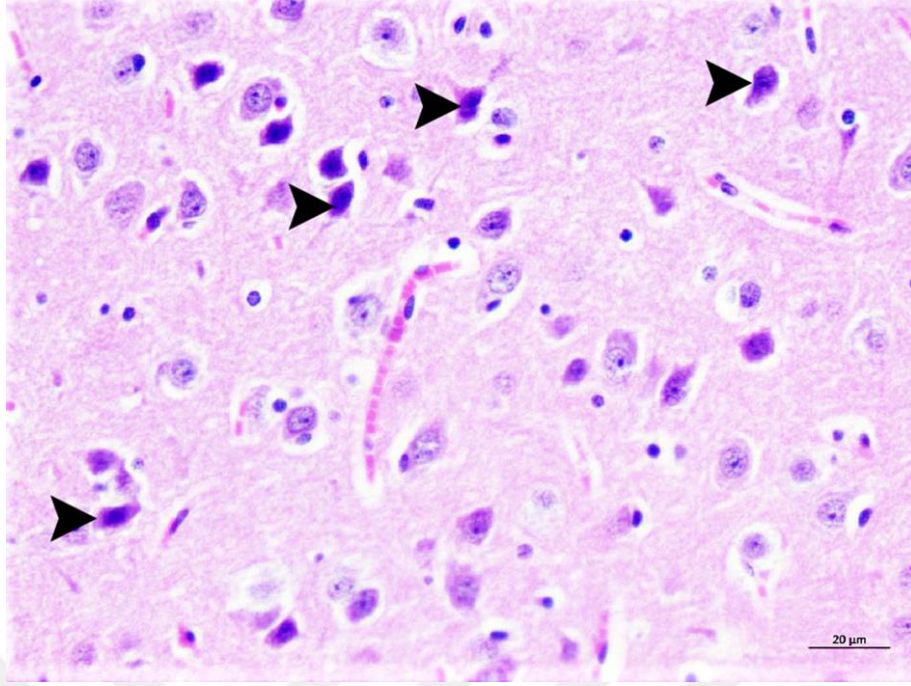
Şekil 4.9. Beyin dokusu ACE grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları), nekroz (oklar), paransim damarlarda hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.10. Beyin dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), perañşim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.11. Beyin dokusu IMI grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (Nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları), perañşim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.12. Beyin dokusu IMI+PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), paranşim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)

Grup I) Kontrol: Bağırsak dokularının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).

Grup II) Probiyotik: Bağırsak dokularının normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 4.14).

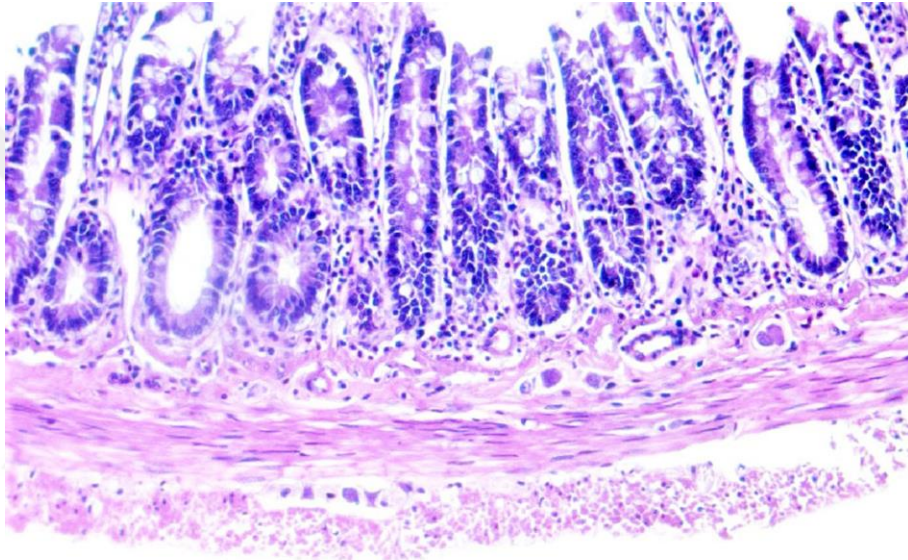
Grup III) Acetamidrid: Bağırsak dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, bağırsak villuslarında atrofi, mukozada şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları, mukoza epitelinde deskuamasyon ve erezyon görüldü (Şekil 4.15).

Grup IV) Acetamidrid + Probiyotik: Bağırsak dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, mukoza katmanında şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu, mukoz epitelinde çok hafif düzeyde dejenerasyon belirlendi (Şekil 4.16).

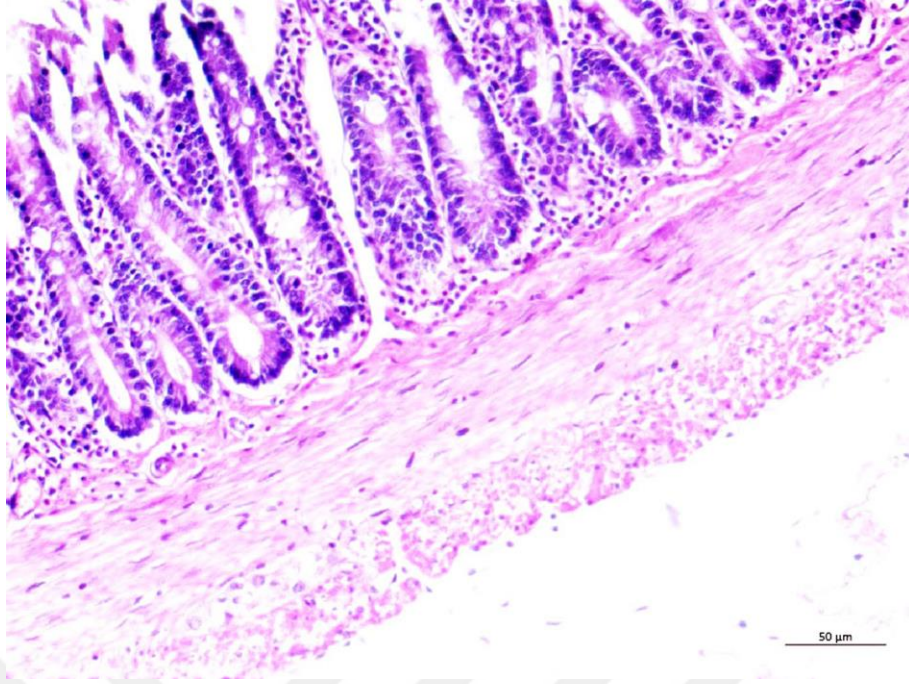
Grup V) Imidacloprid: Bağırsak dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, mukoza epitelinde şiddetli düzeyde erezyon ve deskuamasyon, mukozada ve kript

epitellerinde şiddetli dejenerasyon ve nekroz, serozada ödematöz kalınlaşma gözlendi (Şekil 4.17).

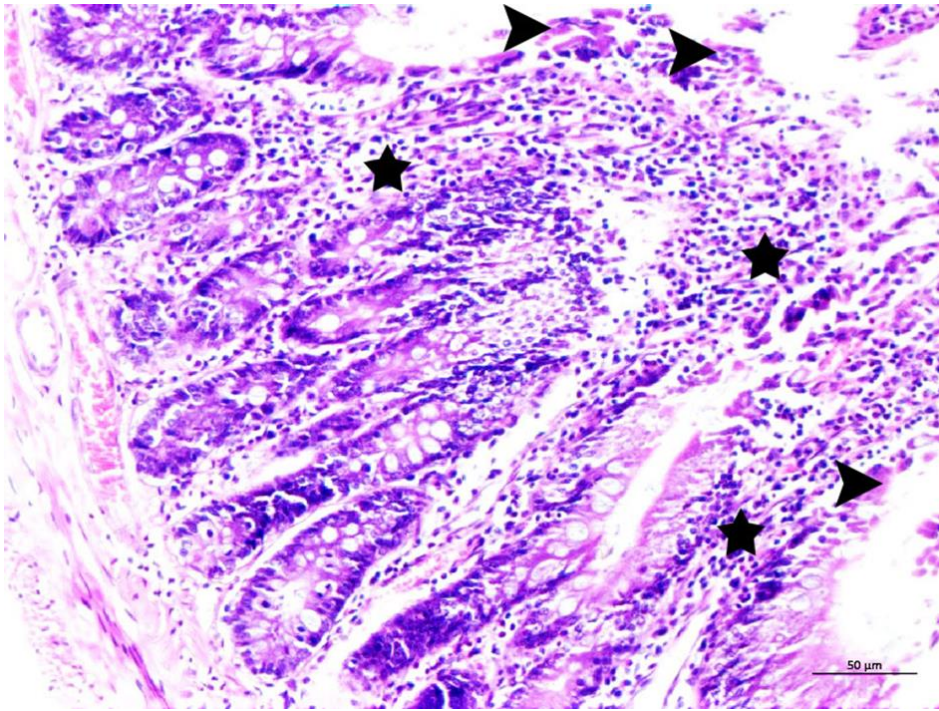
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Bağırsak dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, mukoza katmanında hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu, mukoza epitelinde hafif düzeyde dejenerasyon ve tunika muskulariste hafif ödem (Şekil 4.18). Histopatolojik bulgular tablo 4.13 da özetlenmiştir.



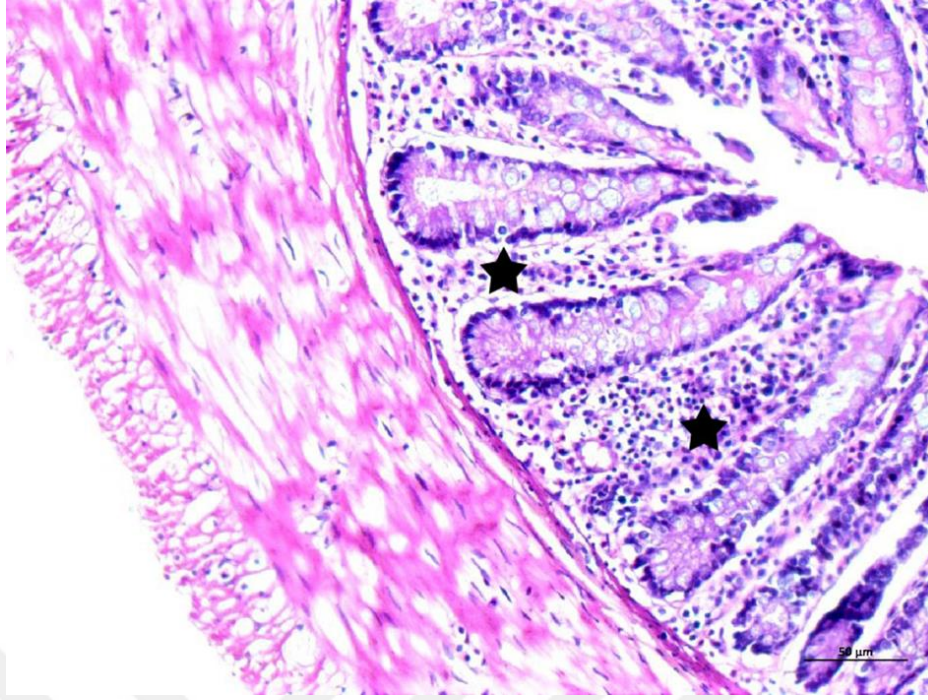
Şekil 4.13. Bağırsak dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



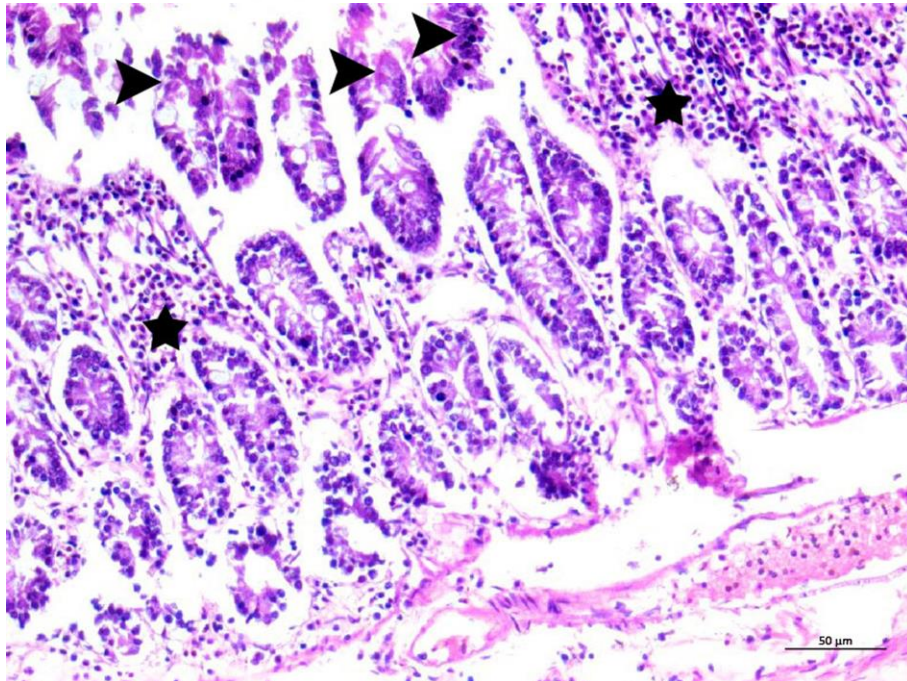
Şekil 4.14. Bağırsak dokusu PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



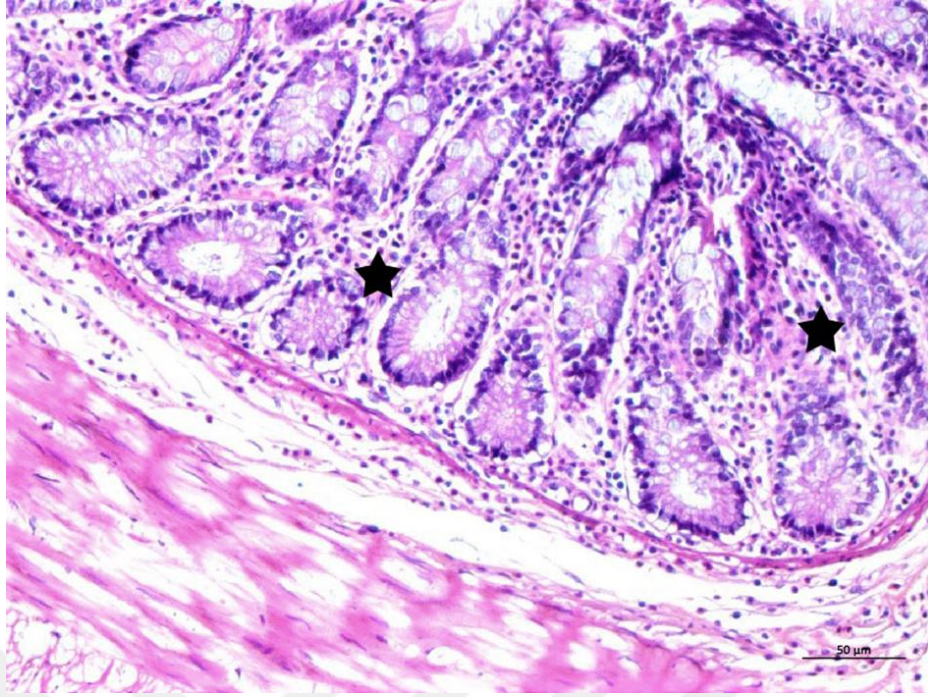
Şekil 4.15. Bağırsak dokusu ACE grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (Mukoza epitelinde şiddetli düzeyde deskuamasyon ve erezyon (okbaşları), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), H&Ex40)



Şekil 4.16. Bağırsak dokusu ACE+PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Mukoza katmanında hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), mukoza epitelinde hafif düzeyde dejenerasyon, H&Ex40)



Şekil 4.17. Bağırsak dokusu IMI grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Mukozada şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldızlar), mukoza epitelinde şiddetli düzeyde erezyon deskuamasyon ve nekroz (okbaşları), tunika mukozada ödem, H&Ex40)



Şekil 4.18. Bağırsak dokusu IMI+PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Mukoza epitelinde hafif düzeyde dejenerasyon, mukoza katmanında hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu, H&Ex40)

4.4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Grup I) Kontrol: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, 8 OHdG ekspresyonunun negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.19).

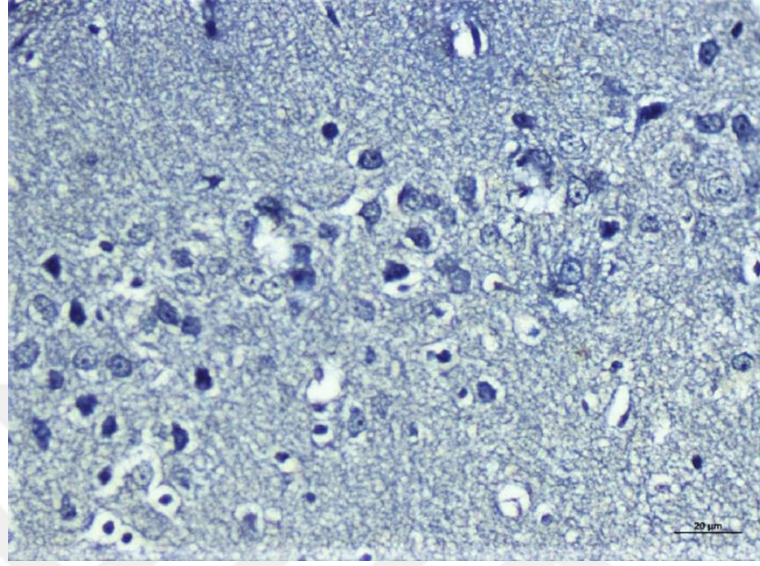
Grup II) Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, 8 OHdG ekspresyonunun negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.20).

Grup III) Acetamidrid: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, şiddetli düzeyde 8 OHdG ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.21).

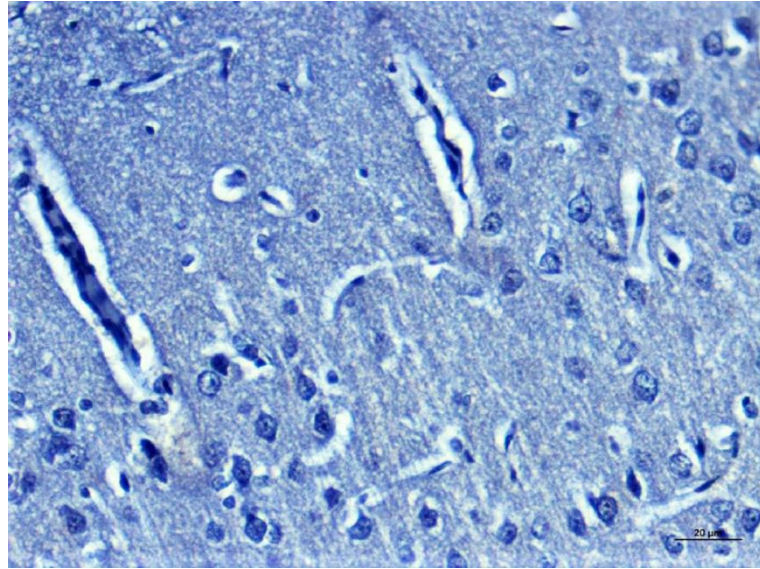
Grup IV) Acetamidrid + Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde 8 OHdG ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.22).

Grup V) Imidacloprid: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, paransimde nöron uzantılarında şiddetli düzeyde 8 OHdG ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.23).

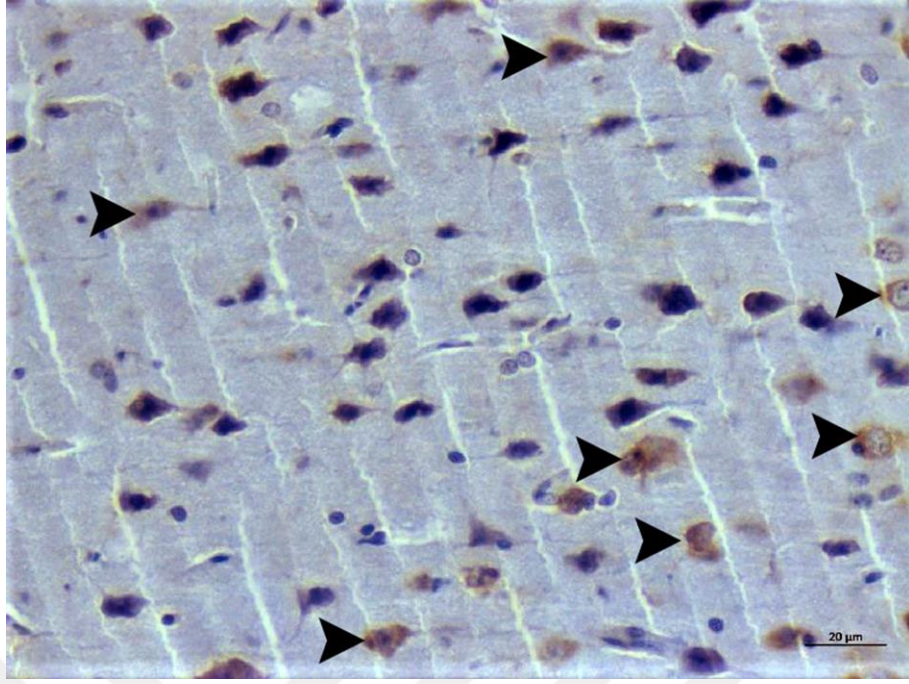
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde 8 OHdG ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.24). İmmunohistokimyasal bulgular tablo 4.12 de özetlenmiştir.



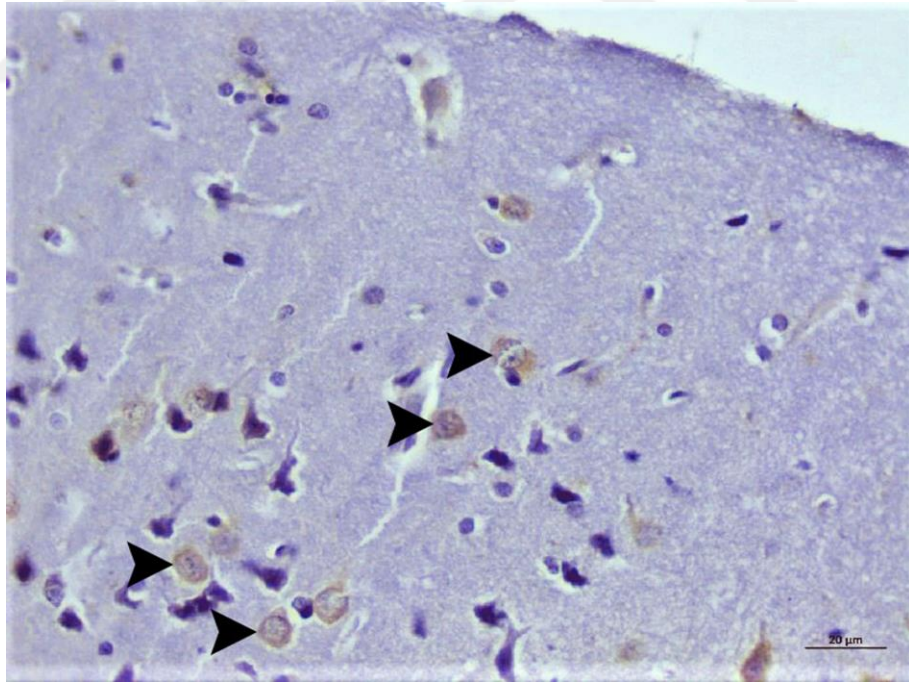
Şekil 4.19. Beyin dokusu kontrol grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları Bar:20µm.



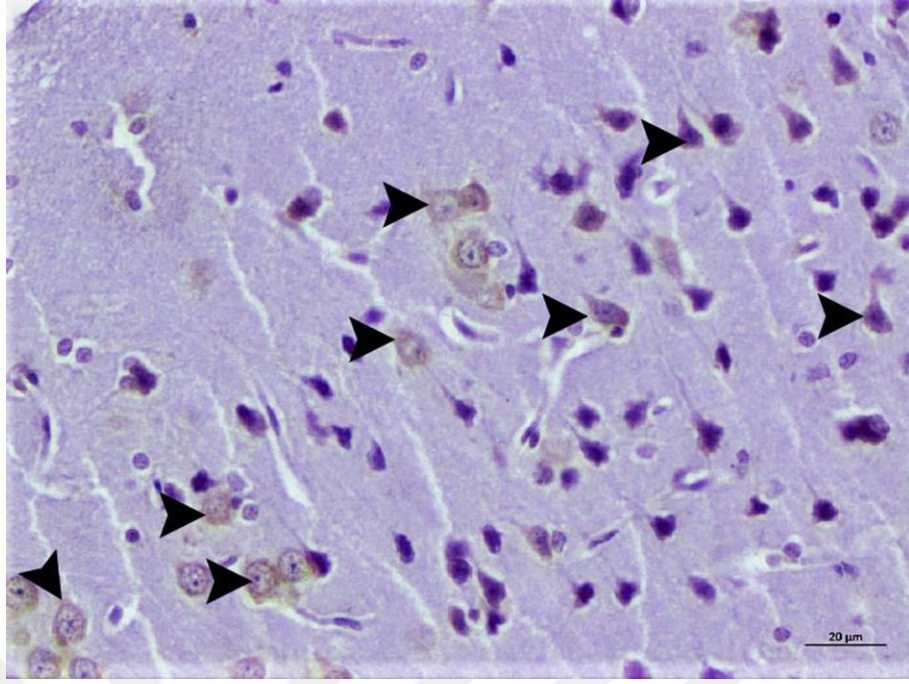
Şekil 4.20. Beyin dokusu PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları, Bar:20µm.



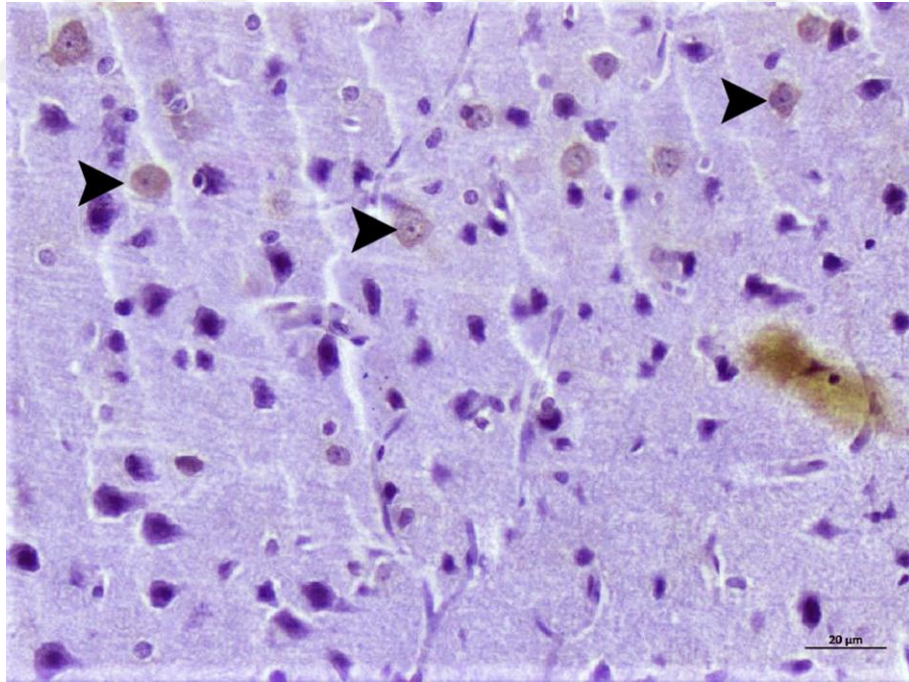
Şekil 4.21. Beyin dokusu ACE grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları (Şiddetli düzeyde stoplazmik 8 OHdG ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.22. Beyin dokusu ACE+PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde stoplazmik 8 OHdG ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.23. Beyin dokusu IMI grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları (Nöronlarda şiddetli düzeyde stoplazmik 8 OHdG ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.24. Beyin dokusu IMI+PRO grubu 8 OHdG IHC boyama sonuçları. (Nöronlarda hafif düzeyde stoplazmik 8 OHdG ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)

Grup I) Kontrol: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, GFAP ekspresyonunun negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.25).

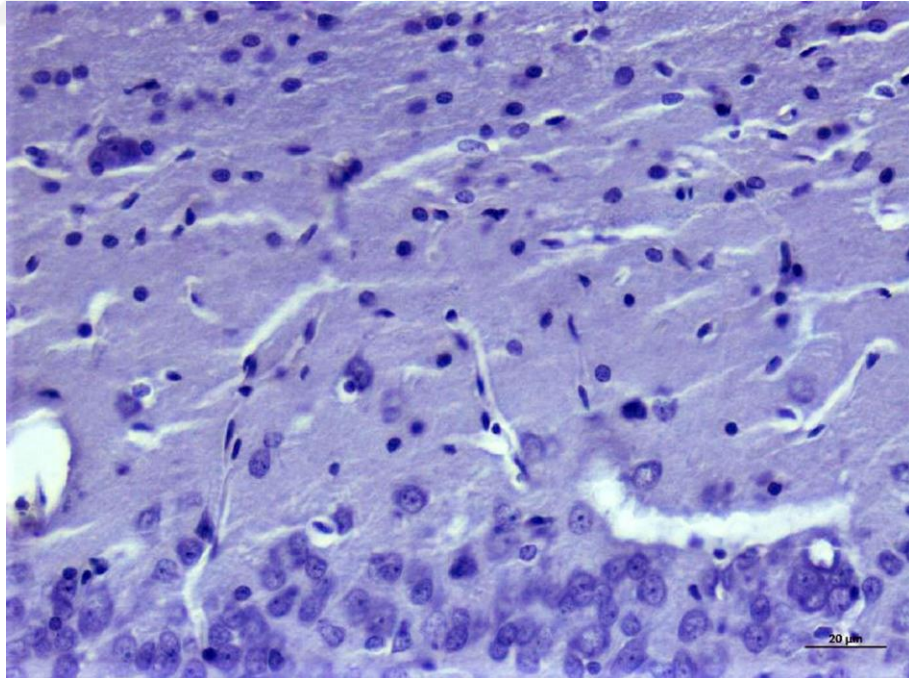
Grup II) Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, GFAP ekspresyonunun negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).

Grup III) Acetamidrid: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.27).

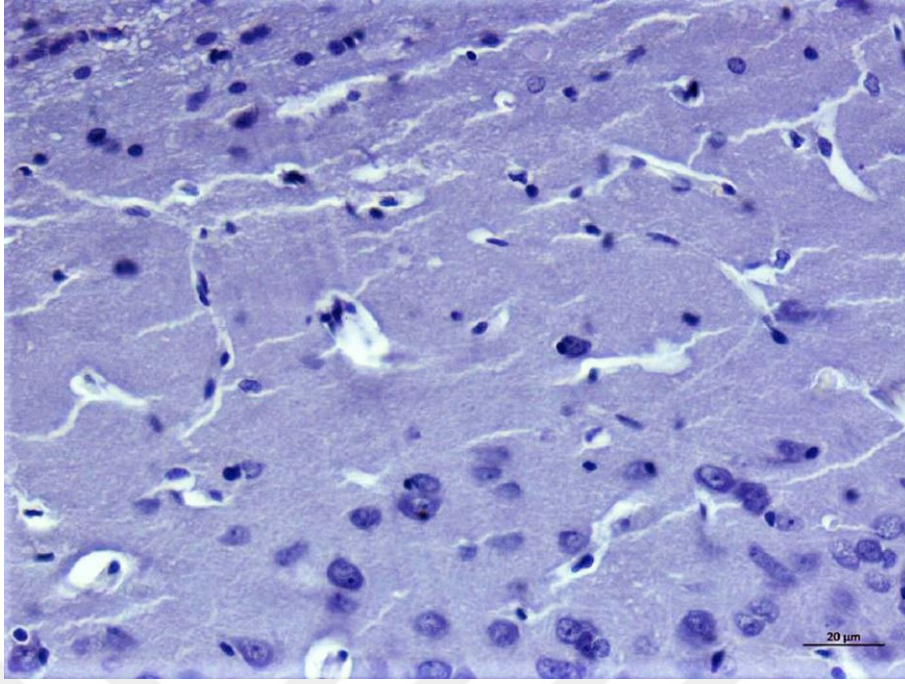
Grup IV) Acetamidrid + Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde GFAP ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.28).

Grup V) Imidacloprid: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, paranşimde nöron uzantılarında şiddetli düzeyde GFAP ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.29).

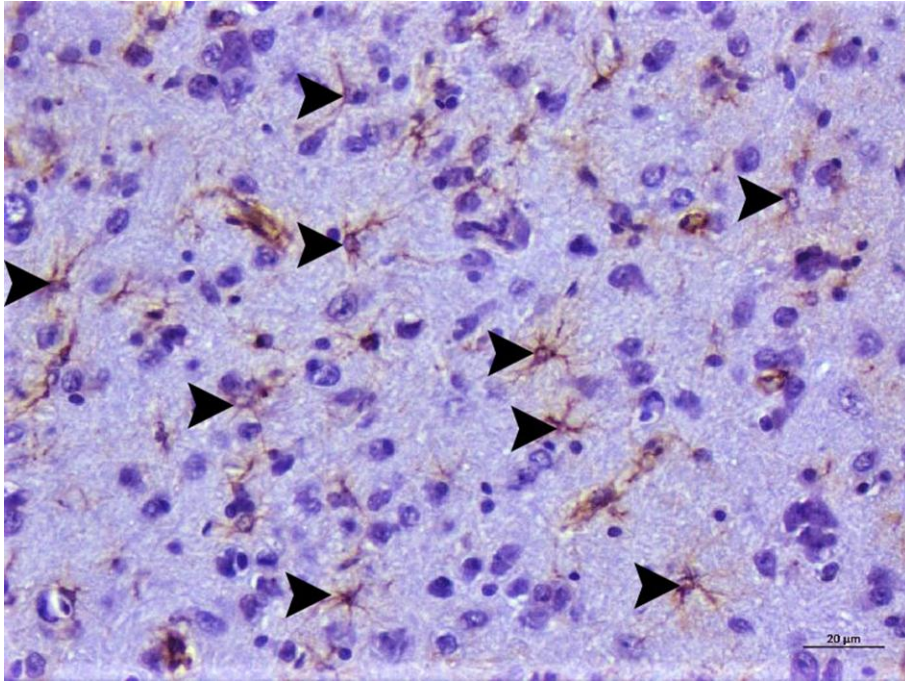
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Beyin dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde GFAP ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.30). immunohistokimyasal bulgular tablo 4.12 de özetlenmiştir.



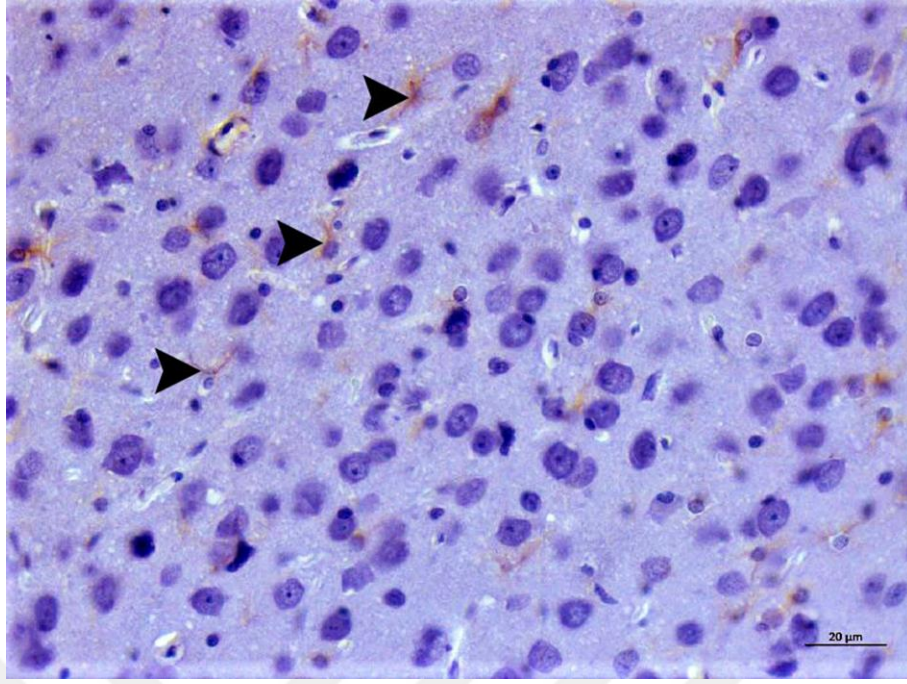
Şekil 4.25. Beyin dokusu kontrol grubu GFAP IHC boyama sonuçları, Bar:20µm.



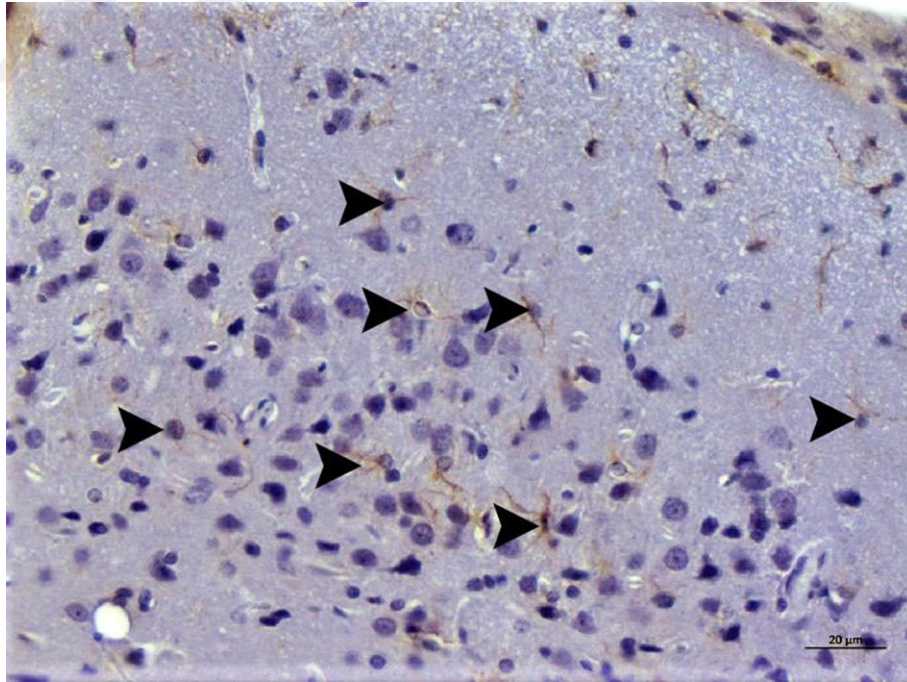
Şekil 4.26. Beyin dokusu PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları, Bar:20μm.



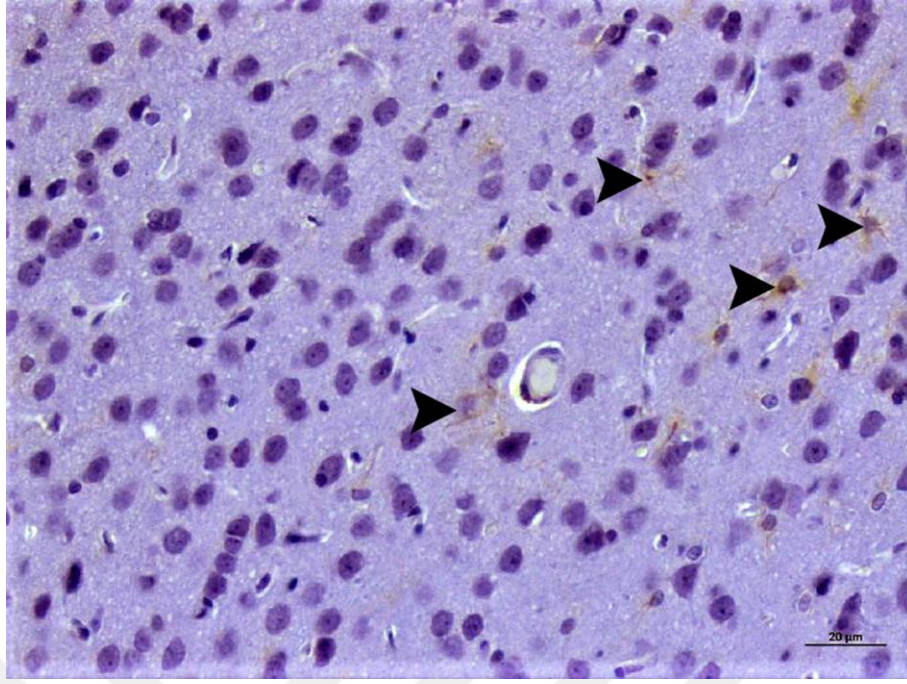
Şekil 4.27. Beyin dokusu ACE grubu GFAP IHC boyama sonuçları (Şiddetli düzeyde stoplazmik GFAP ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.28. Beyin dokusu ACE+PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde stoplazmik GFAP ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.29. Beyin dokusu IMI grubu GFAP IHC boyama sonuçları (Nöronlarda şiddetli düzeyde stoplazmik GFAP ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20μm)



Şekil 4.30. Beyin dokusu IMI+PRO grubu GFAP IHC boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde stoplazmik GFAP ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20µm)

Tablo 4.12. Beyin dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması

	Kontrol	PRO	ACE	ACE + PRO	IMI	IMI+ PRO
Nöronlarda dejenerasyon	-	-	+++	+	+++	+
Nöronlarda nekroz	-	-	+++	-	++	-
Damarlarda hiperemi	-	-	+++	++	+++	++
8 OHdG	-	-	+++	+	+++	+
GFAP	-	-	+++	+	+++	+

Grup I) Kontrol: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, IL-6 ekspresyonunun negatif olduğu tespit edildi (Şekil 4.31).

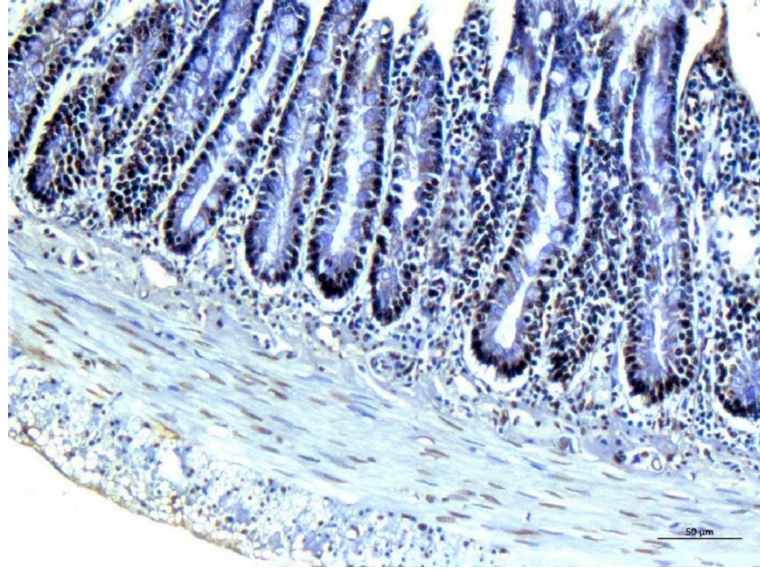
Grup II) Probiyotik: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, IL-6 ekspresyonunun negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.32).

Grup III) Acetamiprid: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, bağırsak mukozasında mukoza epiteli ve yangılı bölgede yangı hücrelerinde şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.33).

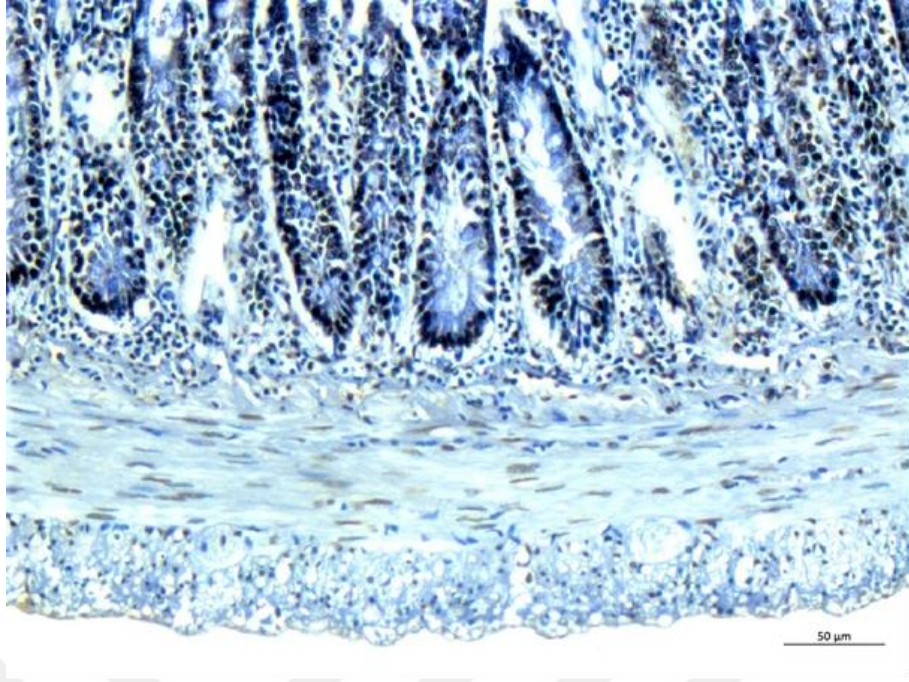
Grup IV) Acetamiprid + Probiyotik: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde bağırsak mukozasında mukoza epiteli ve yangılı bölgede yangı hücrelerinde IL-6 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.34).

Grup V) Imidacloprid: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, bağırsak mukozasında mukoza epiteli ve yangılı bölgede yangı hücrelerinde şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.35).

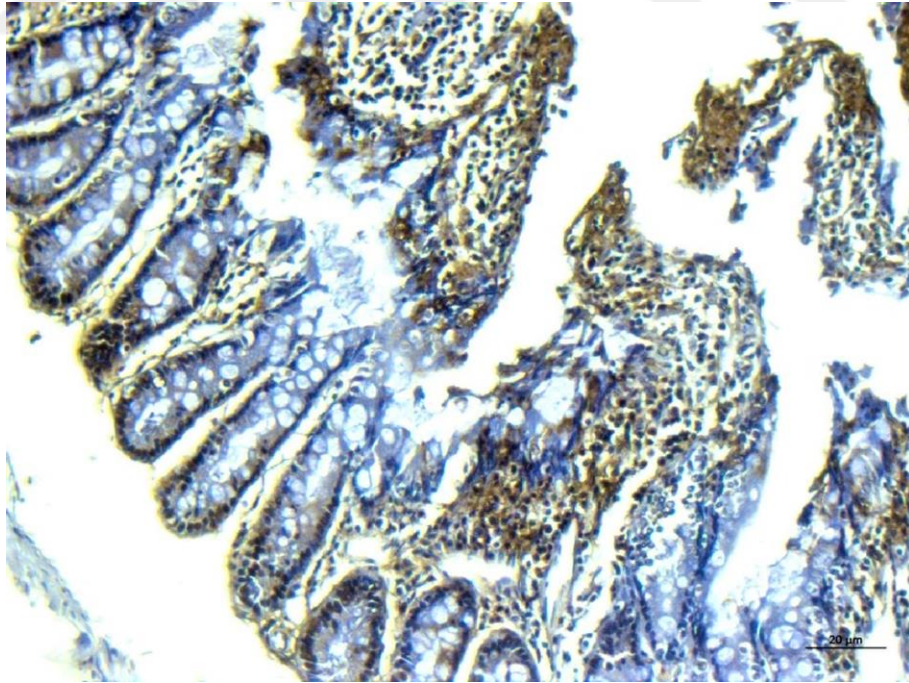
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Bağırsak dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, hafif düzeyde bağırsak mukozasında mukoza epiteli ve yangılı bölgede yangı hücrelerinde IL-6 ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.36).
Immunohistokimyasal bulgular tablo 4.13 da özetlenmiştir.



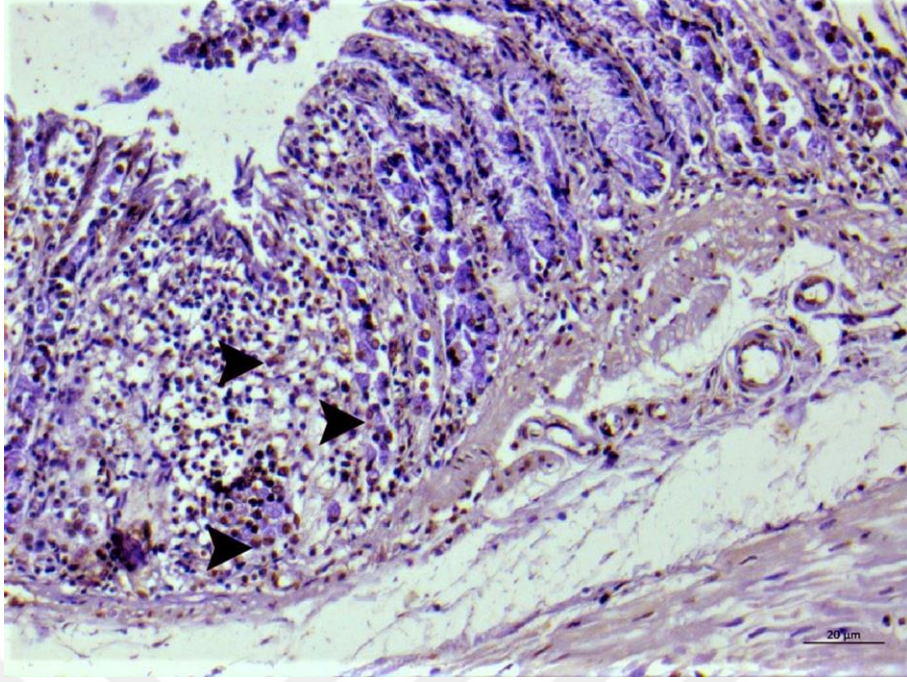
Şekil 4.31. Bağırsak dokusu kontrol grubu IL-6 IHC boyama sonuçları, Bar:20µm.



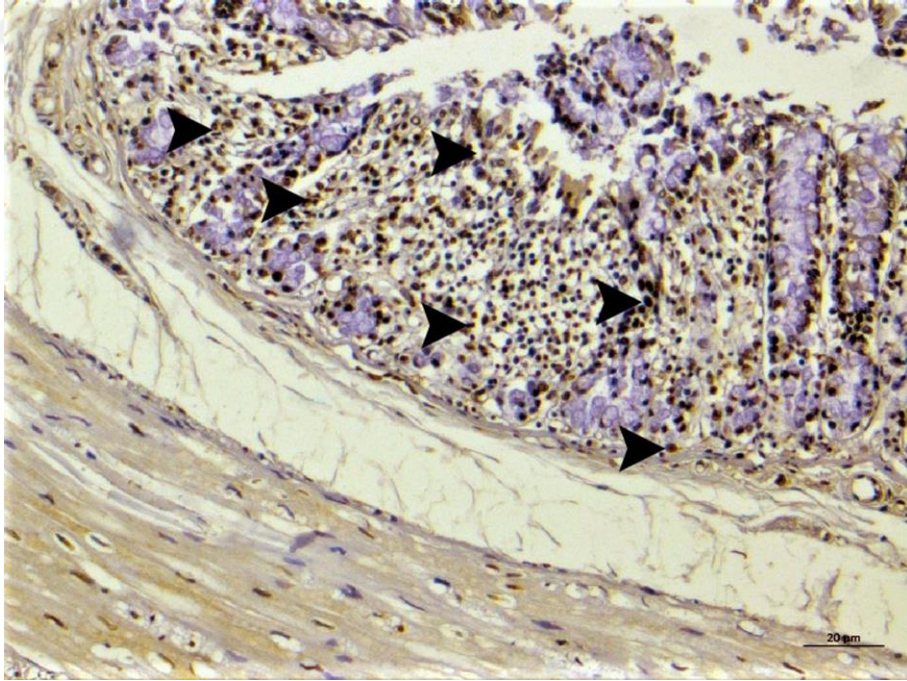
Şekil 4.32. Bağırsak dokusu PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları, Bar:20µm.



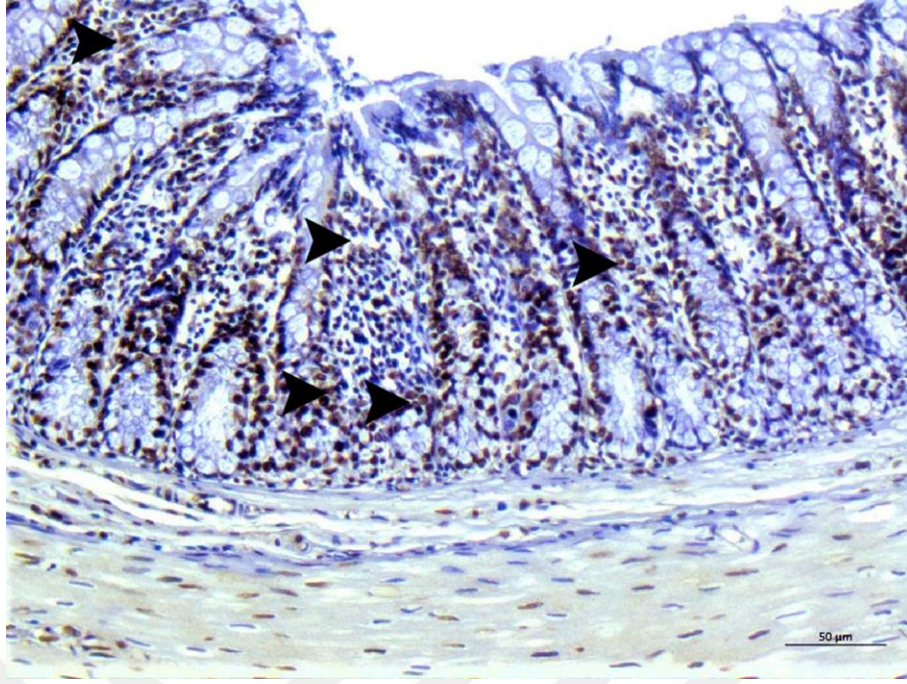
Şekil 4.33. Bağırsak dokusu ACE grubu IL-6 IHC boyama sonuçları (Mukozada mononukleer hücrelerde ve mukoza epitellerinde IL-6 ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20µm)



Şekil 4.34. Bağırsak dokusu ACE+PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları (Mukozada mononukleer hücrelerde ve mukoza epitellerinde hafif düzeyde IL-6 ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20µm)



Şekil 4.35. Bağırsak dokusu IMI grubu IL-6 IHC boyama sonuçları (Mukozada mononukleer hücrelerde ve mukoza epitellerinde şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20µm)



Şekil 4.36. Bağırsak dokusu IMI+PRO grubu IL-6 IHC boyama sonuçları. (Mukozada yangı hücrelerinde ve mukozal epitelinde hafif düzeyde IL-6 ekspresyonu (okbaşları), IHC, Bar:20µm)

Tablo 4.13. Bağırsak dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması

	Kontrol	PRO	ACE	ACE + PRO	IMI	IMI+ PRO
Mukoza epitelinde erezyon ülserasyon	-	-	+++	++	+++	++
Mukoza katmanında mononükleer hücre infiltrasyonu	-	-	+++	++	+++	++
Tunica muskulariste ödem	-	-	+++	+	+++	+
IL-6	-	-	+++	+	+++	+

Grup I) Kontrol: Böbrek dokularının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.37).

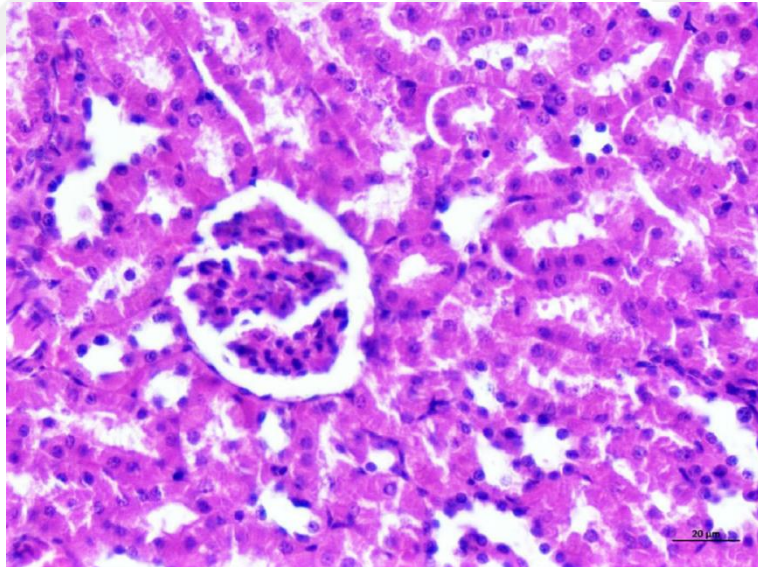
Grup II) Probiyotik: Böbrek dokularının normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 4.38).

Grup III) Acetamiprid: Böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, böbrek tübülüs epitellerinde şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, interstisyel damarlarda hiperemi görüldü (Şekil 4.39).

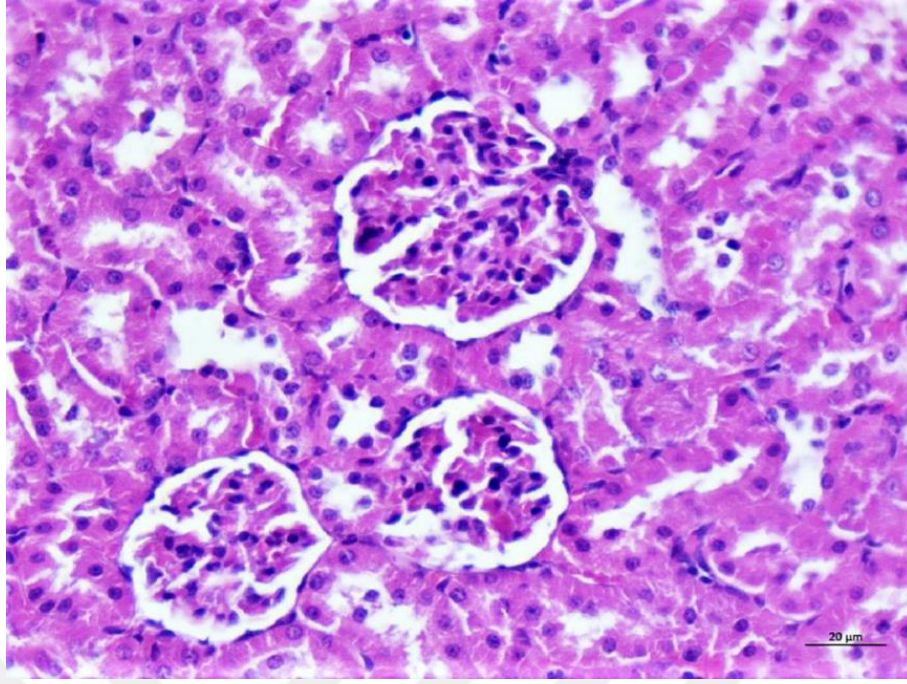
Grup IV) Acetamiprid + Probiyotik: Böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, tübül epitellerinde hafif düzeyde hidropik dejenerasyon, interstisyel damarlarda orta şiddette hiperemi görüldü (Şekil 4.40).

Grup V) Imidacloprid: Böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli düzeyde tübülüs epitellerinde dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi (Şekil 4.41).

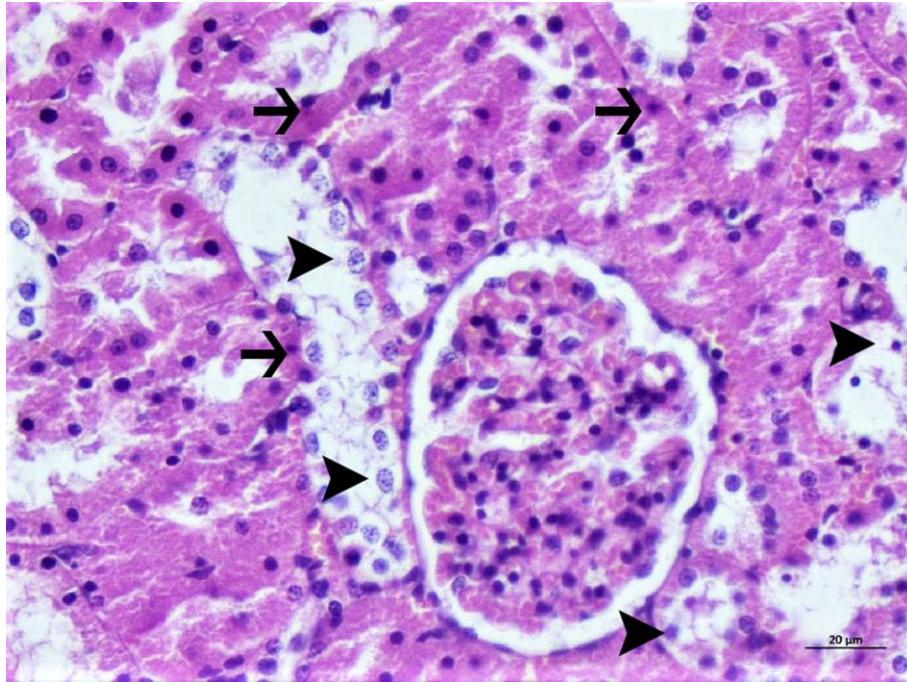
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, tübülüs epitellerinde hafif düzeyde dejenerasyon ve damarlarda hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.42). Histopatolojik bulgular tablo 4.14 de özetlenmiştir.



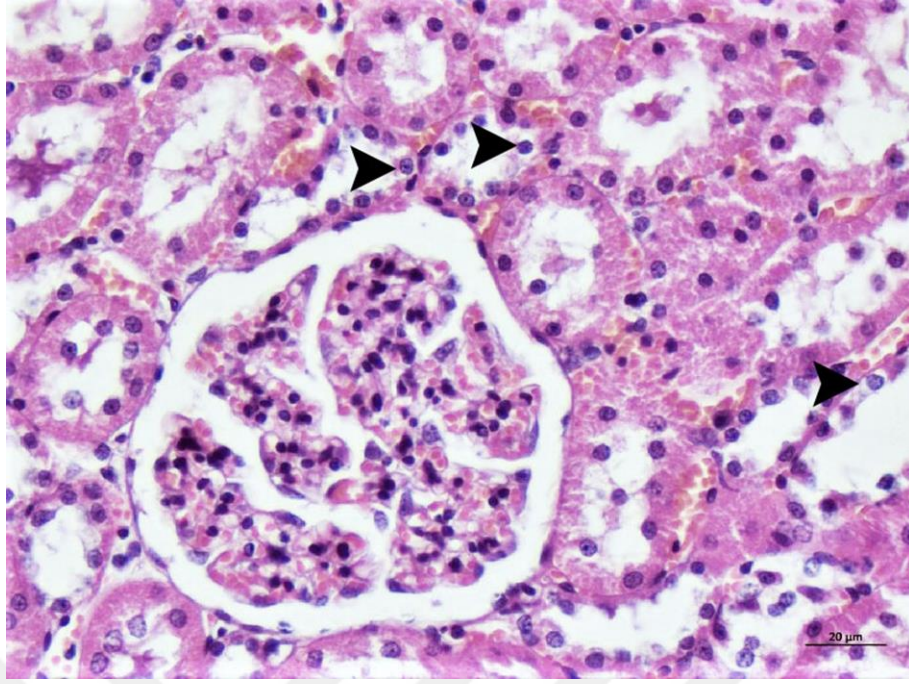
Şekil 4.37. Böbrek dokusu kontrol grubu hematoxilen-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



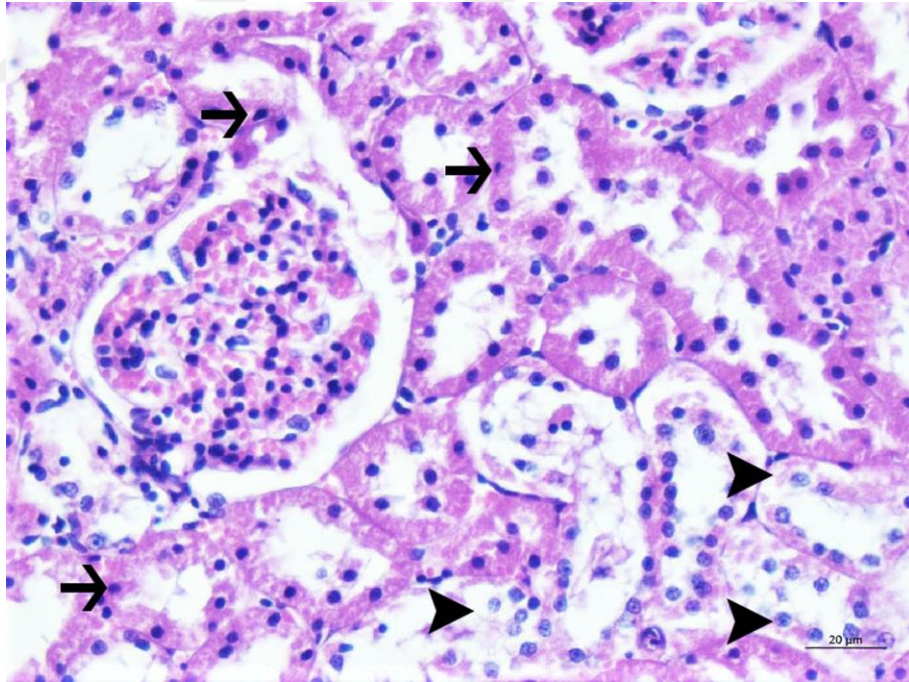
Şekil 4.38. Böbrek dokusu PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



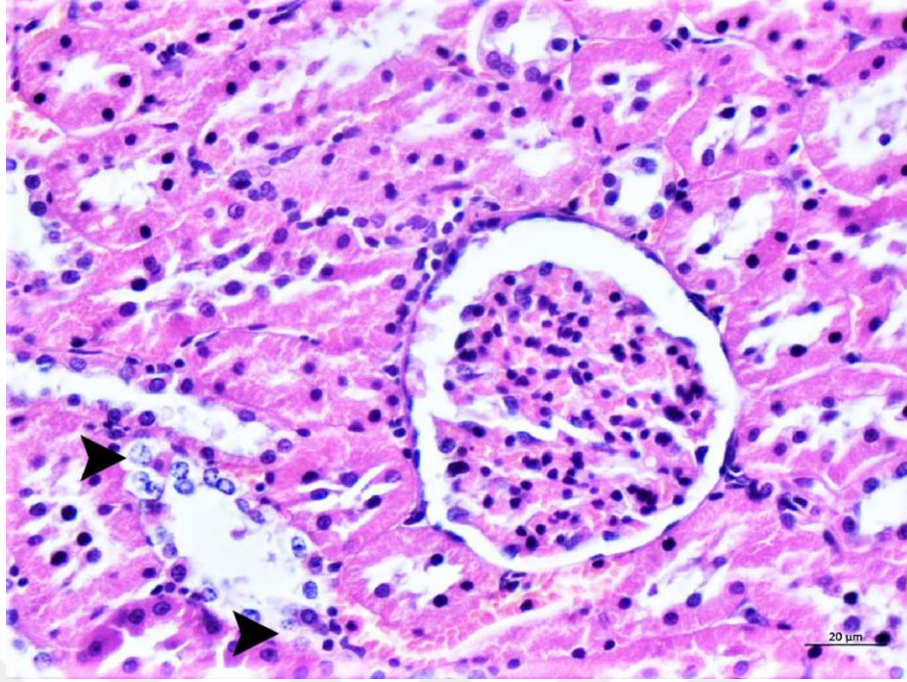
Şekil 4.39. Böbrek dokusu ACE grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Tübülüs epitellerinde şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları) ve nekroz (oklar), paransim damarlarda hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.40. Böbrek dokusu ACE+PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Tübülüs epitellerinde hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), paranşim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.41. Böbrek dokusu IMI grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Tübülüs epitellerinde şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları), nekroz (oklar), paranşim damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.42. Böbrek dokusu IMI+PRO grubu hematoxilen-eozin boyama sonuçları (Tübülüs epitellerinde hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), paranşim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)

Tablo 4.14. Böbrek dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması

	Kontrol	PRO	ACE	ACE+ PRO	IMI	IMI+ PRO
Tübül eptellerinde dejenerasyon	-	-	+++	+	+++	++
Tübül eptellerinde nekroz	-	-	++	-	++	-
Damarlarda hiperemi	-	-	+++	++	+++	++

Grup I) Kontrol: Karaciğer dokularının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.43).

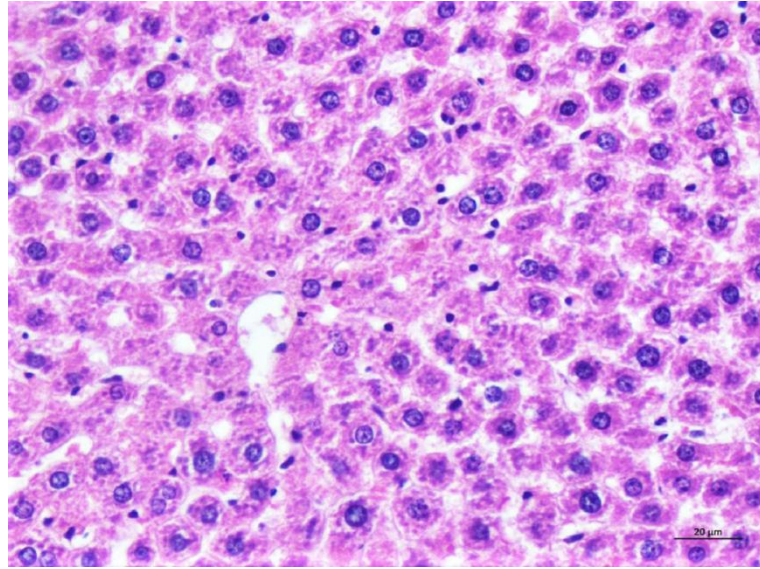
Grup II) Probiyotik: Karaciğer dokularının normal histolojik görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 4.44).

Grup III) Acetamiprid: Karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, hepatositlerde dejenerasyon nekroz ve paranşimal damarlarda hiperemi gözlemlendi (Şekil 4.45).

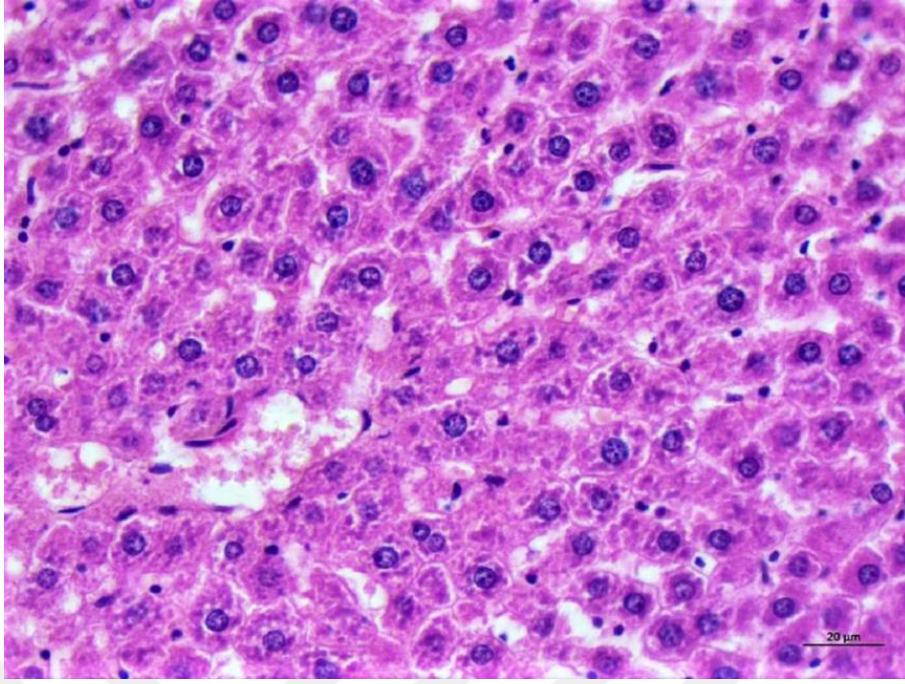
Grup IV) Acetamiprid + Probiyotik: Karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, tubül epitellerinde hafif düzeyde hidropik dejenerasyon, interstisyel damarlarda orta şiddette hiperemi görüldü (Şekil 4.46).

Grup V) Imidacloprid: Karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, özellikle santral bölgede hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz, damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi görüldü (Şekil 4.47).

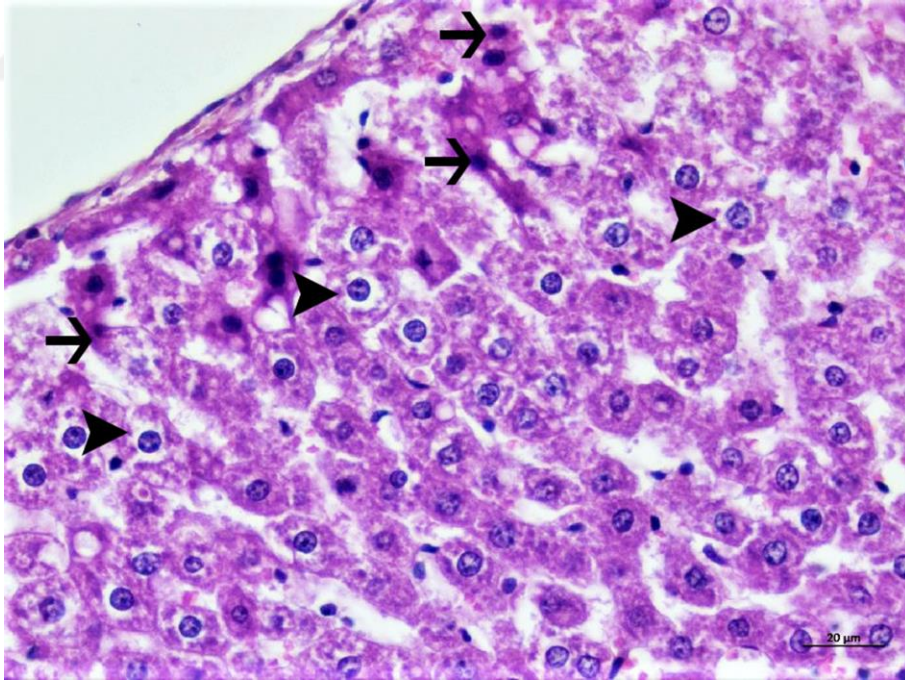
Grup VI) Imidacloprid+ Probiyotik: Karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, hepatositlerde hafif düzeyde dejenerasyon ve damarlarda hiperemi tespit edildi (Şekil 4.48). Histopatolojik bulgular tablo 4.15 de özetlenmiştir.



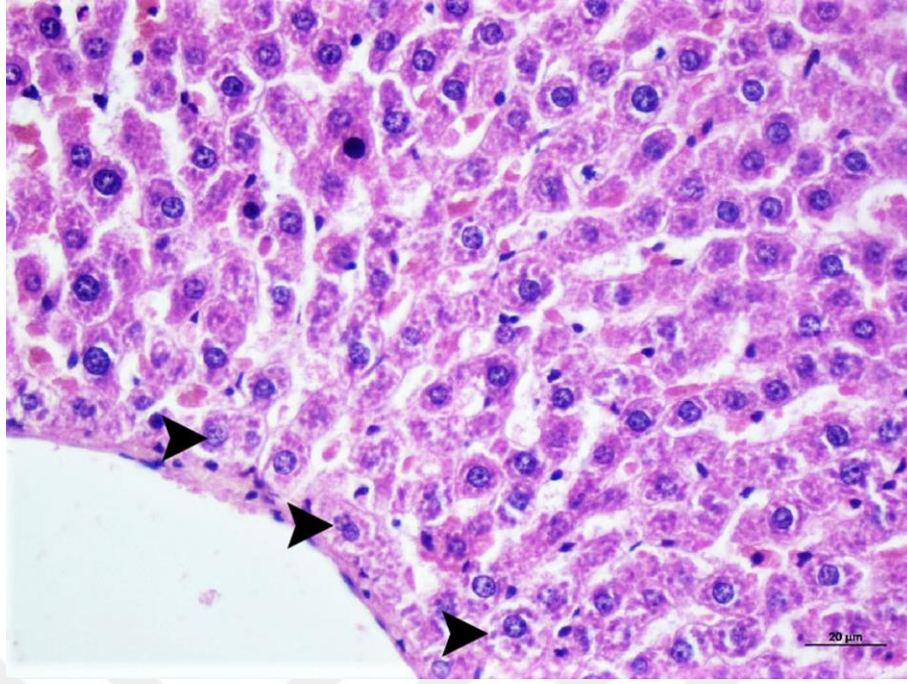
Şekil 4.43. Karaciğer dokusu kontrol grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



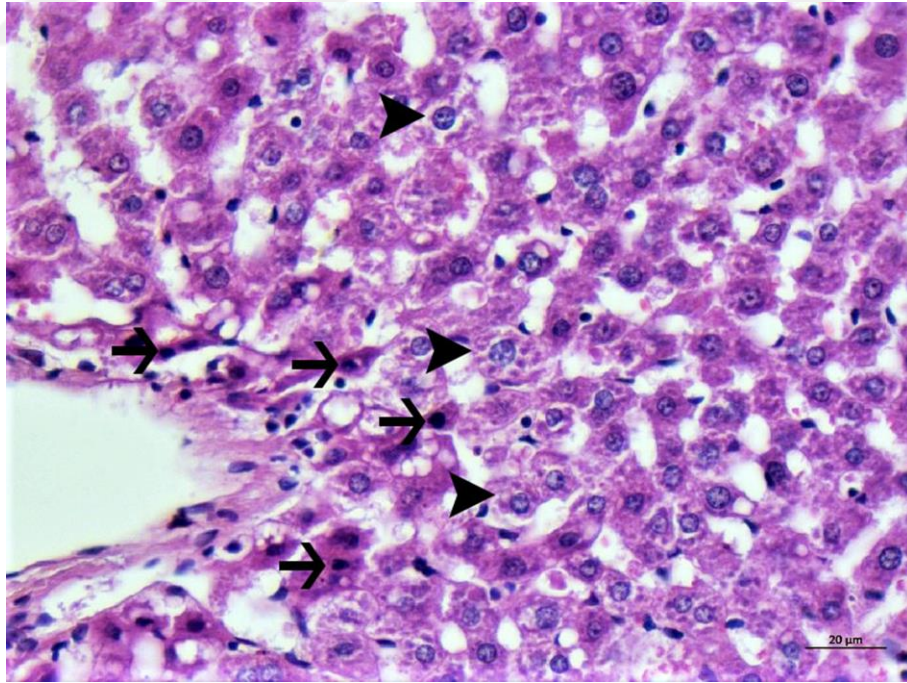
Şekil 4.44. Karaciğer dokusu PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (H&Ex40)



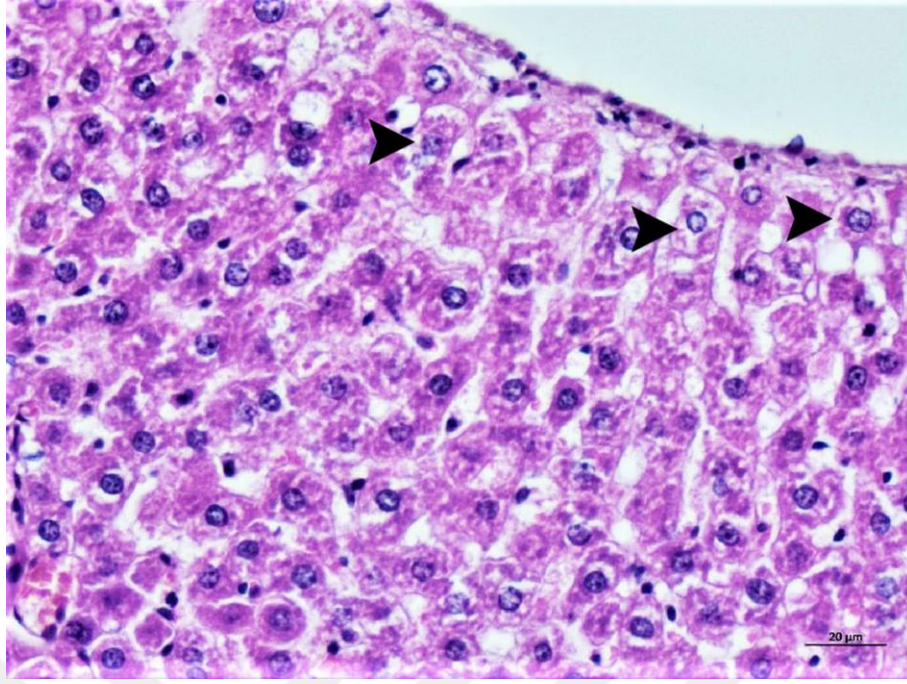
Şekil 4.45. Karaciğer dokusu ACE grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Hepatositlerde şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları), nekroz (oklar), paransim damarlarda hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.46. Karaciğer dokusu ACE+PRO grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), paransim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.47. Karaciğer dokusu IMI grubu hematoksilin-eozin boyama sonuçları (Hepatositlerde şiddetli düzeyde dejenerasyon (okbaşları), nekroz (oklar), paransim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)



Şekil 4.48. Karaciğer dokusu IMI+PRO grubu hematoksilen-eozin boyama sonuçları (Hepatositlerde hafif düzeyde dejenerasyon (okbaşları), paransim damarlarda orta düzeyde hiperemi, H&Ex40)

Tablo 4.15. Karaciğer dokusunda histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguların skorlanması

	Kontrol	PRO	ACE	ACE + PRO	IMI	IMI+ PRO
Hepatositlerde dejenerasyon	-	-	+++	+	+++	++
Hepatositlerde nekroz	-	-	++	-	++	-
Damarlarda hiperemi	-	-	+++	++	+++	++

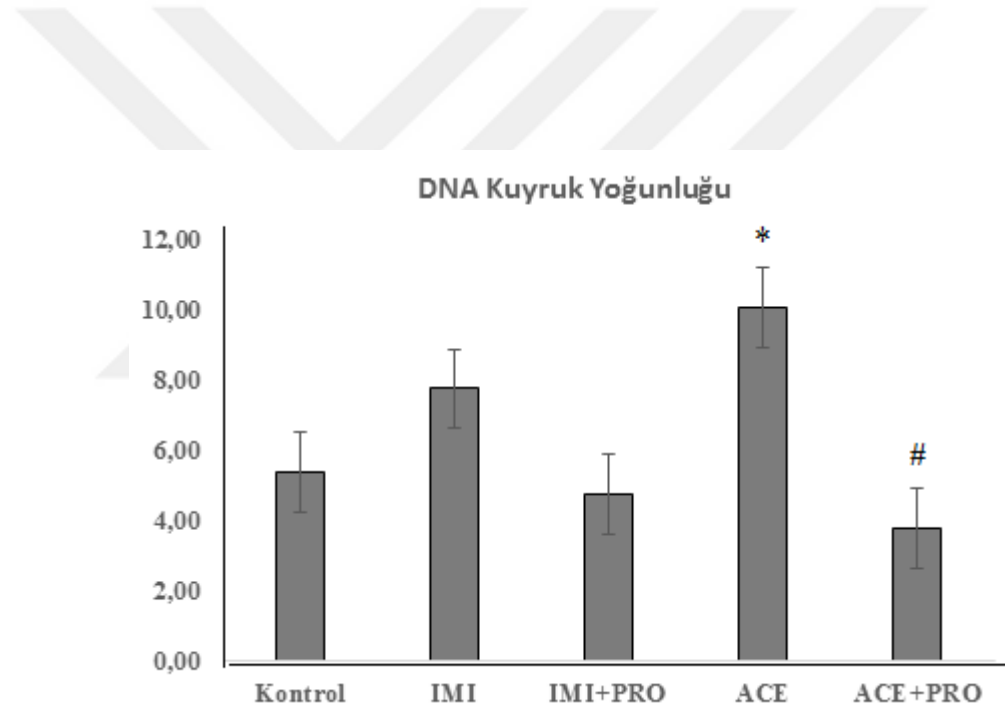
4.5. Genotoksisite Testi Sonuçları (Comet)

İmidacloprid'e maruz kalan gruplarda 3 ay sonra kontrole kıyasla kuyruk yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış gözlemlendi (imidacloprid grubunda %43). Acetamiprid uygulanmış grubun DNA kuyruk yoğunluğu, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p < 0.05$, $p = 0.022$). ACE+PRO grubunda DNA kuyruk yoğunluğu ACE grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p < 0.05$, $p = 0.027$). (Tablo 4.16 Şekil 4.49).

Tablo 4.16. Kontrol ve deney grupları kuyruk yoğunluğuna dayanan Comet analiz sonuçları

Doz grupları	Dna kuyruk yoğunluğu ortalama	Standart Hata
Kontrol	5.42	0.91
İmidacloprid	7.78	1.43
Acetamiprid	10.08*	2.00
İmidacloprid+Probiyotik	4.79	1.04
Acetamiprid+Probiyotik	3.81 [#]	0.51

Değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA'ya göre, Post-Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Dunnett'e göre yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. * işareti Kontrol gruba göre, # işareti ise ACE grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 4.49. Kontrol ve deney grupları Comet analiz sonuçları.

(Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA'ya göre, Post-Hoc çoklu karşılaştırmalı testlerden Dunnett'e göre yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi. * işareti Kontrol gruba göre, # işareti ise ACE grubuna göre anlamlılığı göstermektedir.)

5. TARTIŞMA

Böcek ilaçları; yabancı otları, böcekleri, hayvanları ve hastalık vektörlerini kontrol etmek için tarım ve halk sağlığı alanında tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. ¹⁷¹

Bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda, pestisit kalıntıları gıda zincirine girebildiği gibi maksimum kalıntı sınırını aşmış insan sağlığı açısından büyük tehlike de oluşturabilirler. ¹⁷²

Tarımsal pestisit zehirlenmesi, gelişmekte olan dünyada her yıl en az 250.000 - 370.000 kişiyi öldüren büyük bir halk sağlığı sorunudur. ¹⁷³

Yeni nesil neonicotinoid pestisitlerden olan imidacloprid ve acetamiprid'in delici ve emici ağız yapısı olan böceklere karşı oldukça etkili olduklarını ve bu etkilerini de böcek nAChR'lerine bağlanarak gösterdikleri bulunmuştur. ¹⁰ Bu yeni nesil pestisitler pazarın %11-15'ini kısa sürede ele geçirmişlerdir. ¹⁰ Literatürde neonicotinoidlerin memeli dokuları üzerindeki toksisitesi ile ilgili çalışmalar çok azdır. Ancak pestisit maruziyeti sonucu oluşan toksik etkileri önlemek için, yeni ve ucuz ürün arayışları sürmektedir. Probiyotikler " Bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyerek konakçıyı yararlı bir şekilde etkileyen canlı bir mikrobiyal gıda takviyesi " olarak tanımlamıştır. ¹¹³ Saccharomyces cerevisiae olarak da bilinen S. boulardii, çoklu etiyolojilerden kaynaklanan ishalin tedavisinde ve önlenmesinde yaygın olarak kullanılan, patojenik olmayan bir maya türüdür ve 100 ülkede tıbbi ürünlerin düzenlenmesinde yer alan klinik ve farmasötik bir kullanıma sahiptir. ¹²⁰ Bu nedenle probiyotikler, son dönemlerde bir çok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların yerini almaya başlayan iyi ve ucuz bir alternatif olarak gündeme gelmişlerdir. Ayrıca, probiyotiklerin pestisit aracılı toksisite de yararlı olabileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur. ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Ancak literatürde probiyotik ve pestisit arasındaki ilişki ile ilgili yapılan çalışmalar probiyotik bakteriler ile sınırlı kalmıştır. Mikrobiyota da bulunan ve önemli etkilere sahip

olan probiyotik mantarlarla ilgili yapılan çalışmalar, toksik etkili bakterilerin sebep olduğu diyare tedavisinden ileri bir aşamaya gidememiştir. Biz de bu çalışmamız da 13 hafta boyunca ratlara NOAEL dozda imidacloprid (5.7mg/kg) ve acetamiprid (12.4 mg/kg) vererek kronik bir intoksikasyon oluşturmayı ve S.boulardii vererek karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin dokusu üzerinde pestisitlerin olası toksik etkilerini önlemeyi amaçladık. Çalışmamız da hayvan ağırlıklarına, hematolojik ve biyokimyasal parametrelere, dokularda ki neonikotinoid pestisit birikimine, dokuların histopatolojisine ve immünohistokimyasına ve Comet testi ile genotoksik hasara baktık.

Hayvaların günlük yem ve su tüketimlerinde meydana gelen değişimler kilo kazanımını ve kayıplarını doğrudan etkilemektedir. Pestisit maruziyetinde doza-bağımlı şekilde kilo kaybı yaşandığı ifade edilmektedir. Bhardwaj ve ark.¹⁷⁴ yapmış oldukları bir çalışmada, ratlara 90 gün boyunca oral yol ile 5, 10 ve 20 mg/kg imidakloprid verilmiş ve 10 mg/kg (NOEL) doz grubunda vücut ağırlık artışı olmamıştır ancak en yüksek doz grubunda (20 mg / kg / gün) önemli toksisite semptomları ile birlikte hayvanların vücut ağırlık artışlarında önemli bir azalma olduğu ifade edilmiştir. Mondal ve ark.¹⁷⁵ yaptıkları deneyde Wistar Albino türü ratlara 13 hafta boyunca 5, 20 ve 40 mg/kg dozlarında acetamiprid oral yol ile verilmiş, 8. haftadan itibaren 40 mg/kg alan grup da kilo kaybı belirlenmiş, 10. haftadan itibaren 20mg/kg doz grubunda kiloda istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlenirken. 5 mg/kg doz grubunda kilo kazanımı ya da kaybı gözlenmemiştir. Sudha'nın S. Boulardii ile yaptığı bir çalışmada 130, 650 ve 1300 mg/kg/gün dozlarında probiyotik, Sprague-Dawley ratlara 28 gün boyunca oral yol ile verilmiş ve 28 gün sonunda vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış bulunmamıştır.¹⁷⁶ Çalışmamızı acetamiprid (12.4mg/kg) ve imidakloprid'in (5.7 mg/kg) NOAEL gibi EPA'nın canlı sistemler üzerinde hiçbir yan etkinin gözlenmediğini ileri sürdüğü dozlarla gerçekleştirdik. 13 hafta süren deneyimizde her hafta ratların

ağırlıkları tartılıp kaydedildi, bu süreç içerisinde ratlarda yiyecek ve sudan kaçınma hareketleri ve bunların yanı sıra yorgunluk, hareket kaybı gibi davranış değişiklikleri veya uyuşukluk gözlenmedi. Haftalara göre ağırlık artışı bütün gruplarda normal bir seyir izledi, literatürde ki çalışmalar incelendiğinde, yiyekten kaçınma hareketlerinin imidakloprid için en az 10mg/kg, acetamiprid için ise en az 20mg/kg doz ve üzeri maruziyetlerde meydana geleceği ileri sürülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmanın sonunda, grupların ağırlıkları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilemedi. Bu da literatürde ki diğer çalışmalar ile paralellik gösterdi.

Hematolojik ve biyokimyasal parametreler çevresel stresörlerin neden olduğu değişimlerin belirlenmesinde önemli yer tutmaktadırlar. Biz de çalışmamızda hematolojik ve biyokimyasal parametre olarak baktık. Baktığımız bu hematolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edemedik. Bunun dozların düşüklüğünden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamıza benzer şekilde Bagri ve ark.¹⁷⁷ tarafından yapılan 14 günlük bir çalışma da günde 110mg/kg imidakloprid Swiss albino erkek farelere verilmiş, kan örnekleri incelendiğinde, Hemoglobin, total eritrosit sayısı, total lenfosit sayısı ve nötrofil sayılarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmadığı ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada acetamiprid'in 13 hafta boyunca oral yoldan uygulanması 5, 20 ve 40 mg/kg doz gruplarında TEC, TLC, Hgb, HCT, PLT, MCV, MCH ve MCHC seviyelerinde anlamlı ($P \leq 0.05$) değişime neden olmadığı, 40mg/kg doz grubunda ise 9 ve 13. haftalarda nötrofil ortalama değerlerinde anlamlı bir artış bulunurken, lenfosit sayısında 5, 9 ve 13. haftalarda anlamlı bir azalma bulunmuştur ($P \leq 0.001$). Ancak hiçbir doz grubunda eozinofil, monosit ve bazofil yüzdelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır.¹⁷⁵

Sonuç olarak bizim çalışmamız ile yukarıda ki çalışmaların sonuçları paralellik göstermiştir ve literatür ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Biyokimyasal

parametrelerimizi değerlendirdiğimiz de üre de bir artış olmadı ancak ALT, AST, ALP ve LDH değerlerinde bir yükseliş tespit edildi ama bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Abbassy ve ark.¹⁷⁸ yaptıkları bir çalışmada Albino ratlara düşük (0.365 mg/kg ve 0.943 mg/kg) ve yüksek dozlarda (45 mg/kg ve 56.25 mg/kg) imidacloprid 30 gün süreyle oral yol ile verilmiş ve düşük dozlarda ALT, AST, ALP, LDH, creatinine ve uric acid seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunmamıştır. Vohra ve ark.¹⁷⁹ yaptıkları diğer bir çalışmada, 10 mg/kg ve 20mg/kg imidacloprid oral yol ile 60 gün boyunca Albino ratlara verilmiş ve ALT, AST, ACP ve ALP düzeylerinde her iki doz için de anlamlı bir yükseliş bulunmamıştır. Parametrelerde ki meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile, bunun intoksikasyon sırasında permeabilite artışı, membran hasarı ve hepatosit nekrozuna bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

Bu çalışmalar da imidacloprid'in yaptığı hepatosit dejenerasyonunun, hücre membran permeabilitesini arttırarak transaminazların dolaşım sistemine geçebileceği ifade edilmiştir. Ayrıca bu hasar sonucunda oluşan hepatosit membranında ki transport fonksiyon bozukluğunun serum enzim düzeylerinde yükselişe yol açabileceği de iddia edilmiştir.¹⁷⁹ Bizim çalışmamızda ki istatistiksel olarak anlamlı olmayan serum enzim düzeyi artışlarının sebebinin de bu mekanizmalardan birine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çiftçiler tarafından böceklerin kontrolünde gelişiğüz el pestisit kullanımı, insan ve hayvan dokularının yanı sıra gıdalarda da pestisit birikimine neden olmaktadır.¹⁸⁰

Oral olarak kullanılan ACE gastrointestinal sistemde yaklaşık %100 oranında emilir.¹⁸¹ Karaciğer sitokrom P450 (CYP) enzimleri tarafından metabolize edildikten sonra, dışkı ve idrarla atılır.¹⁸¹ Ford ve ark.^{182,183} ACE verilen ratların beyin ve karaciğer dokuları ile plazma ve idrar örneklerinde ACE ve metabolitlerinin saptandığını bildirmişlerdir. Shi ve ark.¹⁸¹ CYP enzimlerinin inhibe edilmesi sonucunda, beyinde ve

karaciğerde farklı bir pestisit olan clothianidin ve tiyakloprid konsantrasyonlarının arttığını bildirmişlerdir. Devan ve ark.¹⁸⁴ yaptıkları bir çalışmada, Wistar ratlara 90 gün boyunca oral yol ile ACE (27.5, 55 ve 110 mg/kg) verildikten sonra karaciğer ve böbrek dokularında ki ACE düzeyleri araştırılmış ve kalıntılar tespit edilmiştir. Bu çalışma uzun süreli ACE uygulamasının, çeşitli dokularda kalıntı bırakabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde Yi-Wang ve ark.¹⁸⁵ farelerde yaptıkları bir deneyde, tandem kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş sıvı kromatografi yöntemini kullanarak karaciğer ve böbrek dokularında ACE kalıntıları tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada rat karaciğer ve böbrek dokularında ki kalıntı düzeyi ölçümleri, LC-MS yardımı ile Girit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Karaciğer dokusunda imidacloprid kalıntısı, imidacloprid grubunda 0.0435 ± 0.044 ug/g bulunurken probiyotik + imidacloprid grubunda 0.0353 ± 0.0276 ug/g bulunmuştur. Burda probiyotiğin karaciğer de IMI birikimini azalttığı görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Karaciğer de acetamiprid kalıntısı, acetamiprid grubunda 0.5215 ± 0.1245 µg/g bulunurken probiyotik + acetamiprid grubunda 0.2070 ± 0.0545 ug/g bulunmuş ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkmıştır ($p < 0.005$).

Böbrek dokusunda imidacloprid kalıntısı, imidacloprid grubunda 0.3808 ± 0.6054 ug/g bulunurken probiyotik + imidacloprid grubunda 0.1628 ± 0.0759 µg/g bulunmuştur. Burda probiyotiğin böbrek de IMI birikimini azalttığı görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Böbrek de acetamiprid kalıntısı, acetamiprid grubunda 0.8910 ± 0.1572 µg/g bulunurken probiyotik + acetamiprid grubunda 0.1923 ± 0.1039 µg/g bulunmuş ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkmıştır ($p < 0.001$).

Probiyotik alan gruplarda ki kalıntı düzeyleri karaciğer ve böbrek için istatistiksel olarak çok anlamlı oranda düşmüştür. Bunun sebebinin, probiyotiğin toksik maddelerin absorpsiyonunu azaltarak veya GIS de toksik maddenin metabolizmasını hızlandırarak sistemik dolaşıma geçişlerini azaltıp ve böylece dokularda toksik maddelerin birikim oranlarını düşürdüğünü düşünmekteyiz.

İmidacloprid ve acetamiprid oral yoldan verildiklerinde sırasıyla yaklaşık %92 ve %100 oranında absorbe edilirler. Absorbe edildikten sonra portal dolaşım sistemi ile karaciğer'e giden IMI ve ACE orda CYP450 ile metabolize edilir, metabolitleri feçes ve idrarla atılırken, metabolize edilmeyen kısımları sistemik dolaşıma geçer. Bizim çalışmamızda, sadece IMI ve ACE verilen grupların dokularında verilen toksik maddelerin biriktiğini tespit ettik. Ancak ACE birikimi IMI birikiminden yaklaşık 10 kat daha fazlaydı. Bunun sebebinin IMI'nin karaciğerde daha fazla metabolize edilmesi olabileceği gibi dokular tarafından tutulumunun da daha az olduğunu düşünüyoruz. Ayrıca IMI'nin kronik verilişte, histopatolojik incelemede bağırsaklarda ödematöz kalınlaşmalar meydana getirdiğini tespit ettik, bu da IMI'nin ACE'ye göre bağırsaklardan daha az absorbe olmasına neden olmuş olabilir. Sonuç olarak kronik uygulamada ACE'nin dokularda daha fazla birikebileceğini tespit ettik.

IMI+PRO verilen grupta dokularda ki birikim sadece IMI grubuna göre daha azdır ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu da probiyotiğin IMI'nin GIS den emilimi üzerine fazla bir katkısının olmadığını göstermektedir.

ACE+PRO verilen grupta dokularda ki birikim sadece ACE grubuna göre daha azdır ve bu istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu. Bu da probiyotiğin ACE'nin GIS den emilimi üzerine katkısının çok fazla olduğunu göstermektedir. Bunun sebebinin de aşağı da açıklayacağımız mekanizmalar ile olabileceğini düşünüyoruz.

Condette ve ark.¹⁸⁶ yaptıkları çalışma da, kronik Organofosfatlı pestisitlere maruz kalan ratlarda, gastro-intestinal sistem epitel hücre membran permeabilitesinin arttığı ve tight junctionların (sıkı bağlantı noktaları) lokalizasyonları ve ekspresyonlarının bozulduğu gösterilmiştir. Bu bozulan bağırsak bariyer fonksiyonu da toksik maddelerin feed-forward mekanizması ile paraselüler absorpsiyonunun artmasına yol açar bu nedenle çok fazla sistemik dolaşıma geçen pestisit miktarı fazla olur. Dahası, bağırsak bariyer fonksiyonunun kronik olarak hasarlanması sızıntı (geçirgen) bağırsak sendromuna sebep olabileceği ileri sürülmektedir.¹⁸⁷ Birçok çalışma bir probiyotik olan lactobaciller'in bağırsak bariyer fonksiyonunu artırma kabiliyeti olduğunu ve konakta pestisit tarafından meydana getirilen ikincil bir hasarı önlediğini ileri sürmektedirler. Örneğin L. Plantarum MB452'un tight junction proteinleri olan occludin, ZO-1, ZO-2, ve cingulin'in Caco-2 intestinal hücre hattında ekspresyonlarını arttırdığı bulunmuştur.^{188, 189} Sonuç olarak insektisitlerin GIS de hasar oluşturarak bariyeri bozduğu, probiyotiklerin de bozulan bariyeri düzelttiği görülmektedir. Bizim deneyimizde kullandığımız probiyotik de IMI ve özellikle ACE'nin GIS den emilimini bu şekilde azaltmış olabilir.

Şentürk ve ark.¹⁹⁰ yaptığı çalışma da potansiyel toksik ajanlara kronik maruziyetin kronik inflamasyona neden olabileceği ifade edilmiştir. İnflamasyonda salgılanan pro-inflamatuvar sitokinler inflamasyonda rol oynayan kaskadı tetikleyerek inflamasyon sürecine katkıda bulunurlar. Düzgüner ve ark.¹⁹¹ yaptıkları çalışmada, 30 gün boyunca 1mg/kg imidacloprid verilen ratlarda TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerde artış meydana geldiği ve kronik inflamasyon gözlendiğini ifade edilmiştir.

Zakostelska ve ark.¹⁹² yaptıkları çalışmada probiyotiklerin, farelerde dextran sodium sulfate ile indüklenen kolit modelinde, pro-inflamatuvar sitokinleri azaltarak pestisit maruziyeti ile ilişki inflamatuvar reaksiyonları önlediği gösterilmiştir. Aynı çalışma da probiyotikler intestinal epitel de NF-kB aktivitesini downregüle ederek ve

mesenterik lenf nodlarında regülatuar T hücre popülasyonunu arttırarak yaygın inflamasyonu engellemiştir. Meyvelerden izole edilen ve en yaygın olarak kullanılan probiyotik mantar olan *S. Boulardii*, GI mukozadan absorbe olamadığı için sistemik etki gösteremez, sadece lümen içinde etkisini göstermektedir.¹⁹³ *S. boulardii* patojen mikroorganizmalar ile lümen içinde besinler ve mukozal reseptörler için yarışmaktadır. Koruyucu etkilerinden bir diğeri de Tümör Nekroz Faktör- α ve interleukin (IL) -6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını azaltmasıdır.^{9, 193-195} Ek olarak, *S. boulardii*, bir anti-enflamatuar sitokin olan IL-10'u ve epitel büyüme faktörü üretimini de arttırmaktadır.¹⁹⁶ Everard ve ark.¹⁹⁷ *S. Boulardii* tedavisinin hepatik ve sistemik enflamasyonu azalttığını, ve bu enflamasyonu da, varsayılan bir bağırsak-karaciğer aksı ile meydana getirdiğini ileri sürmüşlerdir. Biz de çalışmamız da, bağırsakta bir pro-inflamatuar sitokin olan, IL-6 düzeyine baktık. IMI ve ACE verilen gruplarda IL-6 ekspresyonunun şiddetli düzeyde arttığı bulunurken probiyotik verilen gruplarda bu artışın hafif düzeyde olduğunu bulduk. Bu sonuçlar bize IMI ve ACE'nin GIS de pro-inflamatuar sitokin olan IL-6 düzeyini arttırarak inflamasyona sebep olduğu, *S. Boulardii*'nin ise IL-6 seviyesinde ki artışı azaltarak inflamasyonu önlemeye çalıştığını göstermiştir. Yukarıda ki çalışmalarda da insektisitlerin GIS de pro-inflamatuar sitokin miktarını arttırarak inflamasyona sebep olduğu, probiyotiklerin de bunu önlemeye çalıştığını görmüştük. Bizim çalışmamız da bu çalışmalarla paralellik gösterdi.

S. Boulardii ise inflamasyonu azaltarak artmış olan pestisit absorpsiyonunu azaltmış olabilir.

Yapılan çeşitli çalışmalar *Lactobacillus* türlerinin günlük ürünlerden ve buğdaydan OP pestisitleri uzaklaştırdığını göstermiştir.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ İndirek kanıt olarak lactobillerin salgıladıkları fosfataz enzimleri aracılığı ile OP pestisitleri metabolize edebileceği ileri sürülmektedir.¹⁹⁸ Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, bir probiyotik

olan *L.brevis* WCP902'nin pestisitleri degrade edebilme kabiliyetinin fonksiyonel OP hidrolaz (OpdB) geninin ekspresyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.²⁰¹ Yapılan bir çalışma da bitki probiyotik bakteri özelliklerini gösteren, *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.1788'in neonikotinoid pestisit olan imidacloprid'i metabolize edebilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir.²⁰² Bu çalışmalar gösteriyor ki, probiyotikler salgıladıkları bir takım enzimlerle GIS de kimyasal maddeleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. Muhtemel ki bizim kullandığımız probiyotik de GIS de IMI ve özellikle de ACE'yi metabolize ederek absorpsiyonunu azaltmış olabilir.

İlaç etkileşimlerindeki probiyotik ile pestisit birbirini bağlayıp absorpsiyonlarını azaltmış olabilirler. Belki bizim çalışmamız da böyle bir şelasyon meydana gelmiş ve absorpsiyon azalmış olabilir.

İlaç etkileşimlerindeki probiyotik ile pestisit birbirini bağlayıp absorpsiyonlarını azaltmış olabilirler. Birçok çalışma, probiyotiklerin canlılığını, kolonileşme kabiliyetini ve toksik maddelere bağlanma kapasitesini analiz etmiştir. *Lactobacillus casei* DN114001 suşu, in vitro heterosiklik aromatik aminlere bağlanabilir ve bu aminlerin konsantrasyonunu ve genotoksitesini azaltabilir.¹⁴⁷ *Lactobacillus reuteri* NRRL14171 suşu ve *Lactobacillus casei* Shirota suşu ile bifidobakteri suşları aflatoksin B1'e bağlanabilir ve bağırsak sisteminde aflatoksinlerin emilimini önleyebilirler.^{148, 149} *Lactobacillus kefir* suşları, *Clostridium difficile* toksinlerini yüzey katmanı (s katmanı) proteinleri ile bağlayabilmişlerdir.²⁰³ Belki bizim çalışmamız da böyle bir şelasyon meydana gelmiş ve absorpsiyon azalmış olabilir.

Karaciğer detoksifikasyon için hedef bir organdır ve çevresel kirleticilere maruz kalmanın sonucunda çeşitli bozukluklar oluşmasına eğilimlidir. Dokudaki histopatolojik değişiklikler, farklı doku ve organlardaki kimyasalların toksik etkilerini değerlendirmek için hızlı bir yöntem olarak kullanılabilir. Hossam ve ark.²⁰⁴ yaptıkları çalışmada, düşük

doz (NOAEL dozun 1.5 katı) ve yüksek doz (1/10 LD50) acetamiprid Albino ratlara 28 gün boyunca oral yolla verilmiş ve düşük doz grubunun (18 mg / kg) histopatolojik incelemesinde, hepatositler arasında az sayıda inflamatuvar hücre olduğu, yüksek doz grubun da (42.72 mg/kg) inflamatuvar hücreler, hiperplazi gözlenen hepatositler de dejenerasyon ve nekroz gösterilmiştir. Böbrek üzerindeki etkileri ise düşük doz grubunda fokal enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve kortekste glomerüller de hiperemik nekrozlu tübüller olduğunu göstermişlerdir. Ancak yüksek doz grubunda, böbrek dokusu üzerinde ki dejenerasyon karaciğer dokusunda olduğundan daha fazla olduğu bulunmuştur. Düzensiz histolojik yapılar ile displazi formasyonu meydana geldiği açıktır ve çoğu tübüllerin epitellerinin kenarlarında konjesyon ve nekroz bulunmuştur. Zhang ve ark.²⁰⁵ yaptıkları çalışma, acetamiprid'in fare böbrek tübüllerinde ve renal korpüskülde hasar meydana getirdiğini göstermiştir.

Karaciğer hücre hasarı ile ilgili birçok mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan bir tanesi mitokondriyal disfonksiyondur. Bu hasar, yağ asidi beta-oksidasyonunun inhibisyonu, respiratuvar enzimlerin inhibisyonu veya mitokondriyal DNA'ya direk etki gibi birçok yol ile meydana gelebilir. Pestisitler gibi bazı kimyasallar hem beta-oksidasyonu hemde respiratuvar enzimlerin fonksiyonlarını inhibe ederler. Sonuç olarak serbest yağ asitleri metabolize olamaz ve laktat ve reaktif oksijen türlerinin birikimine yol açarlar. Bu radikaller mitokondriyal DNA'ya hasar verdikten sonra, serbest yağ asitleri metabolize olamadığı için karaciğerde birikime yol açarak serbest yağ asitlerinin alımını ve dağılımını arttırıp yağlı karaciğere sebep olurlar. Bunlara ilave olarak, bazı pestisit kimyasalları hepatosellüler nekroza, hepatik yapının disorganizasyonuna, sinüzoidal yapıların bozulmasına ve bu mekanizmalar sebebiyle kanın karaciğere az miktarda gelmesine sebep olabilir.²⁰⁶ Arfat ve ark.²⁰⁷ yaptıkları bir çalışmada, 5, 10 ve 15 mg/kg imidacloprid 15 gün boyunca oral olarak verilmiş ve 15 mg/kg doz grubunda

kontrol grubuna göre şişmiş hücrel nukleuslar, hipertrofik kan damarları ve sitoplazmik lezyonlarla karakterize mild fokal nekroz bulunmuştur. Bunlara ilave olarak yüksek doz grubunda (15mg/kg) böbrek tübüllerinde ve glomerullerinde dejenerasyon ve böbrekte hemoliz meydana gelmiştir. Yaptığımız çalışmada, acetamiprid grubunda hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz gözlenirken, imidacloprid grubunda hepatositlerde dejenerasyon ve nekroz, damarlarda şiddetli düzeyde hiperemi görüldü. Probiyotik ile kombine edilen pestisit gruplarında hepatositler de dejenerasyonun ve hipereminin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Benzer sonuçlar böbrek dokusunda da gözlemlendi. Acetamiprid grubunda böbrek tübülüs epitellerinde şiddetli düzeyde dejenerasyon ve nekroz, interstisyel damarlarda hiperemi görülürken, imidacloprid grubunda şiddetli düzeyde tübülüs epitellerinde dejenerasyon ve nekroz gözlemlendi. Probiyotik ile kombine edilen pestisit gruplarında tübülüs epitellerinde hafif düzeyde dejenerasyon gözlemlendi.

Patolojik bulgular gösteriyor ki kronik pestisit kullanımı hem karaciğer hem de böbrek dokusunda toksik madde birikmesine bağlı olarak dejenerasyona, nekroza ve doku hasarına neden olmaktadır. Burda dikkat çekici nokta IMI'nin çok az birikmesine rağmen ACE kadar her iki organda da hasara sebep olmasıdır. Probiyotik verilen gruplar da ise patolojik hasarın probiyotik verilmeyen gruba göre daha az olduğu görülmektedir. Bunun da probiyotiğin yukarıda anlattığımız mekanizmalara bağlı olarak GIS den neonikotinoidlerin absorpsiyonunu azaltmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Imidacloprid'in ratlarda hedef dışı organizmalarda santral sinir sistemi ve karaciğerde oksidatif stress ve inflamasyona neden olduğu bilinmektedir.²⁰⁸ Abd-Elhakim ve ark.²⁰⁹ yaptıkları bir çalışmada 1mg/kg imidacloprid 60 gün boyunca oral yol ile ratlara verilmiştir. 8-OHdG ve GFAP düzeyleri imidacloprid alan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. 8-OHdG hücrelerde makromoleküllerin oksidatif hasarının biyobelirteci olarak kullanılır. IMI maruziyetinden sonraki benzer

oksidatif hasar, daha önce zebra balığı gibi diğer hedef dışı türlerde rapor edilmiştir. Astroitik aktivasyonla ekspresyonu artan astrosit ara filamentleri olan GFAP, astrositin çeşitli fizyolojik, patolojik şartlar altında reaksiyonunu incelemek için yaygın olarak kullanılan bir marker olarak kabul edilir. Sinir sistemi gelişimi, sinaptik iletim ve sinir doku tamirinde önemli bir rol oynar. Bhardwaj ve ark.¹⁷⁴ 90 gün boyunca yüksek dozlarda imidacloprid'e (20 mg/kg/gün) maruz kalan dişi ratların beyinlerinde serebellumun granüler tabakasında dendrit ve granül kaybı ile nekrotik purkinje hücreleri meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışma, neonicotinoidlere kronik maruziyetin beyni etkilediğini ileri sürmektedir. Dhouib ve ark.²¹⁰ 40 mg/kg ACE'ye maruz kalan ratların cerebellumların da, hücre yapısında ciddi bozulmalar gözlemlemiş, purkinje hücrelerinde nekroz ve serebellumun granüler tabakasında granül kaybı meydana geldiğini bulmuşlardır. Neonicotinoidlerin birincil etki şekli, merkezi sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR'ler) etki etmek, ardından nöro-davranışsal bozukluklara ve motor korteks ve hipokampusta GFAP ekspresyonunun artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte, Abou-Donia ve ark.^{211, 212} GFAP'ın motor korteks ve hippocampus'taki ekspresyonunun arttığını ileri sürdükleri çalışma EPA tarafından değerlendirilmiş ve ACE'nin nörotoksik olduğu belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada da ACE grubunda meninkslerde hiperemi, beyinde nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve hafif düzeyde nekroz gözlenirken, imidacloprid grubunda nöronlarda şiddetli düzeyde dejenerasyon ve orta şiddette nekroz, meningeal damarlarında şiddetli düzeyde hiperemi gözlenmiştir. Probiyotik ile kombine edilen gruplarda ise nöronlarda hafif düzeyde dejenerasyon görülmüştür. Bunlara ek olarak yapılan immünohistokimyasal boyama da ACE ve IMI gruplarında şiddetli düzeyde 8-OHdG ve GFAP ekspresyonları görülürken, probiyotik ile kombine verilen gruplarda hafif düzeyde 8-OHdG ve GFAP ekspresyonları görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı olarak ifade edilmiştir. Bu veriler

bize, IMI ve ACE'nin kan beyin bariyerini aşarak beyinde birikime ve hasara sebep olduğunu göstermiştir. Bu hasar sadece IMI ve ACE verilen grupta probiyotik verilen gruba göre çok daha fazladır. Probiyotik verilen grupta ACE ve IMI'nin GIS den absorpsiyonu azaldığı için hasar belirteç ekspresyonlarının düşük çıkması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Pestisitlerin kullanımının artıyor olması, onların her türlü etkilerinin araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu etkilerden bir tanesi de genotoksisitedir. En yaygın olarak kullanılan testlerden birisi de Cometdir. Comet testi, mikroskop lamı üzerinde agaroz içine gömülen ve parçalanmış hücrelerin elektroforezine dayanır. DNA parçalarının elektrik akımı doğrultusunda hücreden çıkarak ilerlemesi (kuyruk oluşturma) ilkesine dayanır.²¹³ Comet testi, genel olarak genotoksik ajanların DNA hasarını değerlendirmek için sitogenetik testlerden daha hassas bir yöntem olarak kabul edilir. Feng ve ark.²¹⁴ yaptıkları bir çalışmada insan periferik kan lenfositlerinde imidacloprid (0,1 ve 25 mg / L) maruziyetinin etkilerini Comet testi ile incelemişler ve pestisitle muamele görmüş tüm gruplardaki DNA hasar derecelerinin dağılımının, kontrol grubundan önemli ölçüde farklı olduğunu bulmuşlardır (P <0.01). Nikotinik asetilkolin reseptör agonisti olan imidacloprid, memeliler için düşük toksisite göstermiştir, ancak 0.05-0.5 mg / L doz seviyelerinde lenfositlerde DNA hasarına veya genom mutasyonuna neden olabileceği belirtilmektedir. Costa ve ark.²¹⁵ IMI'nin yüksek konsantrasyonlarının (20 µM), Comet skorunu ve insan periferik kan lenfositlerinde mikronükleus sıklığını arttırdığını, ancak düşük dozda IMI'nin (0.2 ve 2 µM) hiçbir etki yapmadığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışma *Laktobacillus casei ATCC334*'ün kanserojen *1,2-dimethylhydrazine* maruz kalan ratlarda DNA hasarını azaltabileceğini göstermiştir.¹⁶¹

Bizim çalışmamız da ACE grubunda ki Comet skoru istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Imidacloprid grubunda da istatistiksel olarak anlamlılık olmasa bile kontrol

grubuna göre skorda bir artış meydana gelmiştir. Bunun sebebi de IMI'nin karaciğerde ACE'ye göre daha fazla metabolize edilip, sistemik dolaşıma daha az miktarda geçmesi olabilir. Probiyotik kombinasyonu yapılan gruplarda ise COMET skoru istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşme tespit edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel olarak oluşturulan kronik toksisite de günümüzde sıklıkla tüketilen S.Boulardii'nin etkilerini incelediğimiz çalışmamızın sonuçları gerçekten umut vericidir.

Sonuç olarak bu çalışmada pestisit kaynaklı toksisite de hakkında fazla bilgi sahibi olmadığımız, probiyotik bir maya olan S. Boulardii'nin in vivo olarak 13 haftalık toksisite üzerine olan etkileri farklı şekillerde incelenmiştir. Kronik maruziyetlerde, düşük doz IMI ve ACE'nin karaciğer ve böbrek dokularında birikebileceğini ve ciddi derecede doku hasarı meydana getirebileceğini probiyotik ile bu hasarın iyileştirilebileceğini göstermiş olduk. Bu dokuların yanı sıra beyin ve böbrek gibi hayati öneme sahip organlarda da neonikotinoidler tarafından kötüleşen tablo probiyotik ile iyileştirilmiştir. Günümüzde zirai alanda yaygın şekilde kullanılan bu pestisitlere düşük doz maruziyet sonucunda genetik materyal üzerinde ciddi toksik etkileri olduğunu, probiyotikler ile bu hasarın düzeyinin azaldığını genotoksik analizimiz ile gösterdik. Çalışmamızda elde edilen verilerin, ileri araştırmalarla desteklenmesi durumunda, S.Boulardii'nin zirai alanda çalışan işçilerde, pestisit satışı yapan perakendecilerde veya herhangi bir durumdan dolayı ortamında bulunup maruz kalma riski yaşayan bireylerde profilaktik olarak kullanılabilir ucuz ve alternatif bir tedavi olabileceğini göstermesi bakımından umut verici olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Yaqoob P. Ageing, immunity and influenza: a role for probiotics? *Proceedings of the Nutrition Society*, 2014, 73: 309-317.
2. Zoghi A, Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S. Surface binding of toxins and heavy metals by probiotics. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2014, 14: 84-98.
3. Monachese M, Burton JP, Reid G. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *J Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78: 6397-6404.
4. Patil S. Probiotics and prebiotics: Fabulous nutritional Supplements. *Indian Journal of Medicine Healthcare*, 2013, 2.
5. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. İçinde: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Springer, 2002: 279-289.
6. Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology*, 2008, 125: 286-292.
7. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey A. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *J Nutrients*, 2013, 5: 1869-1912.
8. Gu Q, Li P. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. İçinde: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, IntechOpen, 2016.

9. Trinder M, Bisanz J, Burton J, Reid G. Probiotic lactobacilli: a potential prophylactic treatment for reducing pesticide absorption in humans and wildlife. *Beneficial microbes*, 2015, 6: 841-847.
10. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, 45: 247-268.
11. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural food chemistry*, 2010, 59: 2897-2908.
12. Crossthwaite AJ, Rendine S, Stenta M, Slater R. Target-site resistance to neonicotinoids. *Journal of chemical biology*, 2014, 7: 125-128.
13. Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin J-M, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science Pollution Research*, 2015, 22: 5-34.
14. Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2015, 121: 78-87.
15. Crosby EB, Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology teratology*, 2015, 49: 81-90.
16. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yilmaz O, Kuloglu T, Gundogdu R, Gür S, Agca A, Ulas M, Çambay Z. Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. *Journal of Environmental Science Health, Part B*, 2012, 47: 434-444.
17. Yardimci M, Sevgiler Y, Rencuzogullari E, Arslan M, Buyukleyla M, Yilmaz M. Sex-, tissue-, and exposure duration-dependent effects of imidacloprid modulated

- by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part I: oxidative and neurotoxic potentials. *Archives of Industrial Hygiene Toxicology*, 2014, 65: 387-398.
18. Chakroun S, Ezzi L, Grissa I, Kerkeni E, Neffati F, Bhourri R, Najjar MF, Hassine M, Mehdi M, Haouas Z. Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats. *Environmental Science Pollution Research*, 2016, 23: 25191-25199.
 19. Shakthi Devan R, Prabu P, Panchapakesan S. Immunotoxicity assessment of sub-chronic oral administration of acetamiprid in Wistar rats. *Drug chemical toxicology*, 2015, 38: 328-336.
 20. Badgular PC, Jain S, Singh A, Punia J, Gupta R, Chandratre GA. Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environmental toxicology pharmacology*, 2013, 35: 408-418.
 21. Costa LG. Toxicology of pesticides: A brief history. İnde: *Toxicology of Pesticides*, Springer, 1987: 1-10.
 22. Tano JZ. Identity, physical and chemical properties of pesticides. İnde: *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis*, IntechOpen, 2011: 1-18.
 23. Plaguicidas C. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. 1998.
 24. Nauen R, Bretschneider T. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*, 2002, 13: 241-245.
 25. Jeschke P, Nauen R. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 2008, 64: 1084-1098.
 26. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 2897-2908.

27. Malev O. Toxic effects of selected neonicotinoids through different organisational levels: in vitro and in vivo studies. Fakultet za znanosti o okolišu, Sveučilište u Novoj Gorici, 2013.
28. Kienle C, Kase R, Werner I. Evaluation of bioassays and wastewater quality. *in vitro and in vivo bioassays for the performance review in the Project "Strategy MicroPoll"*, 2011.
29. Zarn JA, Engeli BE, Schlatter JR. Study parameters influencing NOAEL and LOAEL in toxicity feeding studies for pesticides: exposure duration versus dose decrement, dose spacing, group size and chemical class. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 2011, 61: 243-250.
30. Hoekstra J, Van Ewijk P. Alternatives for the no-observed-effect level. *Environmental Toxicology Chemistry*, 1993, 12: 187-194.
31. Noppert F, Van der Hoeven N, Leopold A In *How to measure no effect: towards a new measure of chronic toxicity in ecotoxicology*, Workshop Report Working Group on Statistics and Ecotoxicology, The Hague, (editör).^(editörler). 1994.
32. Chapman PM, Caldwell RS, Chapman PF. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environmental Toxicology Chemistry*, 1996, 15: 77-79.
33. OECD. Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, Baskı, 1998.
34. Directive E. 15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, 2003, 66: 26-35.
35. Hillocks RJ. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*, 2012, 31: 85-93.

36. Hellweg S, Geisler G. Life cycle impact assessment of pesticides. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 2003, 8: 310-312.
37. Preston BL, Snell TW. Direct and indirect effects of sublethal toxicant exposure on population dynamics of freshwater rotifers: a modeling approach. *Aquatic toxicology*, 2001, 52: 87-99.
38. Preston BL. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: implications for ecological risk assessment. *Environmental Management*, 2002, 29: 311-323.
39. Barata C, Baird DJ, Medina M, Albalat A, Soares A. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 230: 183-194.
40. Naddy RB, Johnson KA, Klaine SJ. Response of *Daphnia magna* to pulsed exposures of chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19: 423-431.
41. Reynaldi S, Liess M. Influence of duration of exposure to the pyrethroid fenvalerate on sublethal responses and recovery of *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology Chemistry: An International Journal*, 2005, 24: 1160-1164.
42. Barry M, Logan D, Ahokas J, Holdway D. Effect of algal food concentration on toxicity of two agricultural pesticides to *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 1995, 32: 273-279.
43. Hooper HL, Sibly RM, Hutchinson TH, Maund SJ. Joint effects of density and a growth inhibitor on the life history and population growth rate of the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 2005, 24: 1140-1145.
44. Hosmer AJ, Warren LW, Ward TJ. Chronic toxicity of pulse-dosed fenoxycarb to *Daphnia magna* exposed to environmentally realistic concentrations.

- Environmental Toxicology Chemistry: An International Journal*, 1998, 17: 1860-1866.
45. Berenzen N, Kumke T, Schulz HK, Schulz R. Macroinvertebrate community structure in agricultural streams: impact of runoff-related pesticide contamination. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2005, 60: 37-46.
 46. Schäfer RB, Caquet T, Siimes K, Mueller R, Lagadic L, Liess M. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, 2007, 382: 272-285.
 47. Yamamoto I. Nicotinoids as insecticides. *Adv Pest Control Res*, 1965, 6: 231-260.
 48. Soloway S, Henry A, Kollmeyer W, Padgett W, Powell J, Roman S, Tieman C, Corey R, Horne C. Nitromethylene insecticides. *Advances in pesticide science, part*, 1979, 2: 206-227.
 49. Abarikwu SO, Adesiyun AC, Oyeloja TO, Oyeyemi MO, Farombi EO. Changes in sperm characteristics and induction of oxidative stress in the testis and epididymis of experimental rats by a herbicide, atrazine. *Archives of environmental contamination toxicology*, 2010, 58: 874-882.
 50. Kollmeyer WD, Flattum RF, Foster JP, Powell JE, Schroeder ME, Soloway SB. Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. *İninde: Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*, Springer, 1999: 71-89.
 51. JMPR. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. 2004.
 52. Mohamed F, Gawarammana I, Robertson TA, Roberts MS, Palangasinghe C, Zawahir S, Jayamanne S, Kandasamy J, Eddleston M, Buckley NA. Acute human

- self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PLoS One*, 2009, 4: e5127.
53. Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB. Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, 2005, 69: 1442-1452.
54. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol*, 2003, 48: 339-364.
55. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 247-268.
56. Kagabu S. Chloronicotynyl insecticides-discovery, application and future perspective. *Rev. Toxicol.*, 1997, 1: 75-129.
57. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 2001, 22: 573-580.
58. EPA U. Pesticide fact sheet: imidacloprid. *Washington, DC*, 1994.
59. Amdur MO, Doull J, Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. *Journal of Occupational Environmental Medicine*, 1993, 35: 76.
60. Hovda LR, Hooser SB. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 2002, 32: 455-467.
61. Casida JE. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of agricultural food chemistry*, 2010, 59: 2923-2931.

62. Nakayama A, Yoshida M, Kagawa N, Nagao T. The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *Journal of Applied Toxicology*, 2019.
63. Kumar A, Verma A, Kumar A. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with a brief review of literature. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 2013, 3: 123-126.
64. Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 2007, 7: 53-66.
65. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*, 2003, 48: 339-364.
66. Malev O. Toxic effects of selected neonicotinoids through different organisational levels. Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za podiplomski študij, 2012.
67. Tomlin C. A world compendium. The e-Pesticide Manual. Thirteen's Edition. Version 3.0 2003-04. *British Crop Protection Council*, 2004.
68. Cox C. Imidacloprid, insecticide fact sheet. *Journal of pesticide reform*, 2001, 21: 15-21.
69. Tobiassen LS, Nielsen E, Nørhede P, Ladefoged O. Report on the health effects of selected pesticide coformulants. *Pest. Res*, 2003, 30: 1-66.
70. Surgan MH. Toxicity tests: "inert" and active ingredients. *Environmental health perspectives*, 2005, 113: A657-A658.
71. Malev O, Klobučar RS, Fabbretti E, Trebše P. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic

- organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2012, 104: 178-186.
72. Sine SM, Engel AG. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature reviews immunology*, 2006, 440: 448.
73. Tennekes H, Zillweger A-B. *The systemic insecticides: a disaster in the making*. Bask1. The Netherlands, ETS Nederland BV, 2010.
74. Jemec A, Tišler T, Drobne D, Sepčić K, Fournier D, Trebše P. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2007, 68: 1408-1418.
75. Tomlin CD. *The pesticide manual: A world compendium*. Bask1. British Crop Production Council, 2009.
76. Buckingham S, Lapied B, Corronc Hl, Sattelle F. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of experimental biology*, 1997, 200: 2685-2692.
77. Zhang Q-X, Feng R, Zhang W, Ding Y, Yang J-Y, Liu G-H. Role of stress-activated MAP kinase P38 in cisplatin-and DTT-induced apoptosis of the esophageal carcinoma cell line Eca109. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2005, 11: 4451.
78. Tomizawa M, Cowan A, Casida JE. Analgesic and toxic effects of neonicotinoid insecticides in mice. *Toxicology applied pharmacology*, 2001, 177: 77-83.
79. Matsuda K, Shimomura M, Kondo Y, Ihara M, Hashigami K, Yoshida N, Raymond V, Mongan NP, Freeman JC, Komai K. Role of loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in its interaction with the insecticide imidacloprid and related neonicotinoids. *British journal of pharmacology*, 2000, 130: 981-986.

80. Matsuda K, Buckingham SD, Freeman JC, Squire MD, Baylis HA, Sattelle DB. Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *British journal of pharmacology*, 1998, 123: 518-524.
81. Zwart R, Oortgiesen M, Vijverberg HP. Nitromethylene heterocycles: Selective agonists of nicotinic receptors in locust neurons compared to mouse N1E-115 and BC3H1 cells. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 1994, 48: 202-213.
82. Tomizawa M, Casida JE. Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. *Toxicology applied pharmacology*, 2000, 169: 114-120.
83. Pauly JR, Marks MJ, Robinson SF, Van de Kamp J, Collins AC. Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 1996, 278: 361-369.
84. Berg DK, Conroy WG. Nicotinic $\alpha 7$ receptors: synaptic options and downstream signaling in neurons. *Journal of neurobiology*, 2002, 53: 512-523.
85. Chang KT, Berg DK. Voltage-gated channels block nicotinic regulation of CREB phosphorylation and gene expression in neurons. *Neuron*, 2001, 32: 855-865.
86. Lindstrom J. Autoimmune diseases involving nicotinic receptors. *Journal of neurobiology*, 2002, 53: 656-665.
87. Parrón T, Hernández AF, Villanueva E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic science international*, 1996, 79: 53-63.
88. Walters J, Casjens H, Goh K. Preliminary Monitoring Results of Imidacloprid and Cyfluthrin Applications for Glassy-Winged Sharpshooter Control in Commercial Areas of Butte County. CDPR, . 2001.

89. Saxena A, Sarin K. Histopathological and biochemical changes in the liver and testes of desert gerbil, after repeated exposures of Thimet (phorate). *Toxicology*, 1980, 18: 133-144.
90. Segawa R, Walters J, Fan S. Preliminary Monitoring Results of Imidacloprid and Cyfluthrin Applications for Glassy-Winged Sharpshooter Control in a Residential Area of Solano County. CDPR, Sacramento, CA. 2004.
91. Fossen M. Environmental fate of imidacloprid. *California Department of Pesticide Regulation*, 2006: 1-16.
92. Gupta S, Gajbhiye V, Agnihotri N. Leaching behavior of imidacloprid formulations in soil. *Bulletin of environmental contamination toxicology*, 2002, 68: 502-508.
93. Rouchaud J, Thirion A, Wauters A, Van de Steene F, Benoit F, Ceustermans N, Gillet J, Marchand S, Vanparys L. Effects of fertilizer on insecticides adsorption and biodegradation in crop soils. *Archives of environmental contamination toxicology*, 1996, 31: 98-106.
94. Tišler T, Jemec A, Mozetič B, Trebše P. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 2009, 76: 907-914.
95. Sarkar M, Biswas P, Roy S, Kole R, Chowdhury A. Effect of pH and type of formulation on the persistence of imidacloprid in water. *Bulletin of environmental contamination toxicology*, 1999, 63: 604-609.
96. Hernández F, Marín JM, Pozo ÓJ, Sancho JV, López FJ, Morell I. Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2008, 88: 409-424.

97. Kralj MB, Černigoj U, Franko M, Trebše P. Comparison of photocatalysis and photolysis of malathion, isomalathion, malaoxon, and commercial malathion—Products and toxicity studies. *Water research*, 2007, 41: 4504-4514.
98. Kolpin DW, Battaglin WA, Conn KE, Furlong ET, Glassmeyer ST, Kalkhoff SJ, Meyer MT, Schnoebelen DJ. Occurrence of transformation products in the environment. İçinde: *Transformation Products of Synthetic Chemicals in the Environment*, Springer, 2008: 83-100.
99. Iwaya K, Kagabu S. Biological properties of the chloronicotinyl insecticide imidacloprid: high selectivity and safer use in practice. *Reviews in Toxicology*, 1998, 2: 121-132.
100. Scholz K, Spitteller M. Influence of groundcover on the degradation of super (14) C-imidacloprid in soil. 1992: 883-888.
101. Bacey J. Environmental Fate of Imidacloprid. Environmental Monitoring and Pest Management Branch. Department of Pesticide Regulation (DPR). California Environmental Protection Agency. Sacramento. 2001.
102. Food FPoEoPRi, Environment t, Residues WEGoP. *Pesticide Residues in Food-1992: Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Rome, 21-30 September 1992*. Baskı. Food & Agriculture Org., 1993.
103. Fossen M. Environmental fate of imidacloprid. California Department of Pesticide Regulation. 2006.
104. Honda H, Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and-aldehyde oxidase systems. *Toxicol Lett*, 2006, 161: 108-114.

105. Schulz-Jander DA, Leimkuehler WM, Casida JE. Neonicotinoid insecticides: reduction and cleavage of imidacloprid nitroimine substituent by liver microsomal and cytosolic enzymes. *Chemical research in toxicology*, 2002, 15: 1158-1165.
106. Schulz-Jander DA, Casida JE. Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol Lett*, 2002, 132: 65-70.
107. Dick RA, Kanne DB, Casida JE. Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. *Chemical research in toxicology*, 2005, 18: 317-323.
108. Tomlin C. The e-Pesticide Manual. *BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL*, 2004.
109. Marín A, Vidal JMn, Gonzalez FE, Frenich AG, Glass C, Sykes M. Assessment of potential (inhalation and dermal) and actual exposure to acetamiprid by greenhouse applicators using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2004, 804: 269-275.
110. Liu M, Lanford J, Casida J. Relevance of [3H] imidacloprid binding site in house fly head acetylcholine receptor to insecticidal activity of 2-nitromethylene- and 2-nitroimino-imidazolidines. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 1993, 46: 200-206.
111. Buckingham S, Balk M, Lummis S, Jewess P, Sattelle D. Actions of nitromethylenes on an α -bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology*, 1995, 34: 591-597.
112. Keith LH, Walker M. *EPA's pesticide fact sheet database*. Bask1. CRC Press, 1992.
113. Ganguly N, Bhattacharya S, Sesikeran B, Nair G, Ramakrishna B, Sachdev H, Batish V, Kanagasabapathy A, Muthuswamy V, Kathuria S. ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *The Indian journal of medical research*, 2011, 134: 22.

114. FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, 2002.
115. Khalighi A, Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. İçinde: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, IntechOpen, 2016.
116. Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 1992, 42: 487-491.
117. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 1999, 116: 1107-1114.
118. Hoyos AB. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases*, 1999, 3: 197-202.
119. Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, 70: 2161-2171.
120. Buts J. Lyophilized *Saccharomyces boulardii*: example of a probiotic medicine. *Revista Gastroenterol Peru*, 2005, 25: 176-188.

121. O'Toole PW, Cooney JC. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008, 2008.
122. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*, 1991, 32: 439.
123. Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1997, 32: 28-31.
124. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, 1999, 276: G941-G950.
125. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 2000, 130: 396S-402S.
126. Juven B, Meinersmann R, Stern N. A review: antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 1991, 70: 95-103.
127. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 1996, 5: 20-24.
128. Pizzorno JE, Murray MT. *Textbook of Natural Medicine-E-Book*. Bask1. Elsevier Health Sciences, 2012.
129. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. *Journal of dairy science*, 1995, 78: 1597-1606.
130. Link-Amster H, Rochat F, Saudan K, Mignot O, Aeschlimann. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 1994, 10: 55-63.

131. Miele E, Baldassano R, Pascarella F, Giannetti E, Troncone R, Staiano A. 1013 Effect of a Probiotic Preparation (VSL# 3) On Induction and Maintenance of Remission in Children with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 2008, 134: A-153.
132. Schultz M, Sartor RB. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology*, 2000, 95: S19-S21.
133. Masson P. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol Lett*, 2011, 206: 5-13.
134. Pimentel D. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural environmental Ethics*, 1995, 8: 17-29.
135. Quigley E. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological research*, 2010, 61: 213-218.
136. Madani FZ, Hafida M, Merzouk SA, Loukidi B, Taouli K, Narce M. Hemostatic, inflammatory, and oxidative markers in pesticide user farmers. *Biomarkers*, 2016, 21: 138-145.
137. Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, Newberry RD. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. *Gut*, 2016, 65: 1100-1109.
138. Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *The Journal of toxicological sciences*, 2008, 33: 85-96.
139. Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 2001, 1: 529-539.

140. Koner B, Banerjee B, Ray A. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian journal of experimental biology*, 1998, 36: 395-398.
141. Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, Finlay BB. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection immunity*, 2008, 76: 4726-4736.
142. Poet TS, Wu H, Kousba AA, Timchalk C. In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicological Sciences*, 2003, 72: 193-200.
143. Trinder M, McDowell TW, Daisley BA, Ali SN, Leong HS, Sumarah MW, Reid G. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016, 82: 6204-6213.
144. Daisley BA, Trinder M, McDowell TW, Collins SL, Sumarah MW, Reid G. Microbiota-Mediated Modulation of Organophosphate Insecticide Toxicity by Species-Dependent Interactions with *Lactobacilli* in a *Drosophila melanogaster* Insect Model. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84.
145. Harishankar MK, Sasikala C, Ramya M. Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *3 Biotech*, 2013, 3: 137-142.
146. Feng Y, Racke KD, Bollag J. Isolation and characterization of a chlorinated-pyridinol-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4096-4098.
147. Nowak A, Libudzisz Z. Ability of probiotic *Lactobacillus casei* DN 114001 to bind or/and metabolise heterocyclic aromatic amines in vitro. *European journal of nutrition*, 2009, 48: 419-427.

148. Oatley JT, Rarick MD, Ji GE, Linz JE. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of food protection*, 2000, 63: 1133-1136.
149. Hernandez-Mendoza A, Guzman-de-Peña D, Garcia H. Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. *Journal of applied microbiology*, 2009, 107: 395-403.
150. Shamloo HB, Golkari S, Faghfoori Z, Movassaghpour A, Lotfi H, Barzegari A, Khosroushahi AY. Lactobacillus Casei decreases organophosphorus pesticide diazinon cytotoxicity in human HUVEC cell line. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2016, 6: 201.
151. Lahtinen S, Haskard C, Ouwehand A, Salminen S, Ahokas J. Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of Lactobacillus rhamnosus strain GG. *Food additives contaminants*, 2004, 21: 158-164.
152. Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Narbad A, Chen YQ, Zhang H, Tian F, Chen W. Protective effects of Lactobacillus plantarum CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol*, 2014, 80: 4063-4071.
153. Kamaladevi A, Ganguli A, Balamurugan K. Lactobacillus casei stimulates phase-II detoxification system and rescues malathion-induced physiological impairments in Caenorhabditis elegans. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 2016, 179: 19-28.
154. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews immunology*, 2009, 9: 313.
155. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature reviews immunology*, 2012, 12: 242.

156. Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2: 16003.
157. Wu G, Xiao X, Feng P, Xie F, Yu Z, Yuan W, Liu P, Li X. Gut remediation: a potential approach to reducing chromium accumulation using *Lactobacillus plantarum* TW1-1. *Sci Rep*, 2017, 7: 15000.
158. Gao B, Chi L, Tu P, Bian X, Thomas J, Ru H, Lu K. The organophosphate malathion disturbs gut microbiome development and the quorum-Sensing system. *Toxicol Lett*, 2018, 283: 52-57.
159. Shehata AA, SchrodL W, Aldin AA, Hafez HM, Kruger M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr Microbiol*, 2013, 66: 350-358.
160. Bouhafs L, Moudilou EN, Exbrayat JM, Lahouel M, Idoui T. Protective effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* BJ0021 on liver and kidney oxidative stress and apoptosis induced by endosulfan in pregnant rats. *Ren Fail*, 2015, 37: 1370-1378.
161. Villarini M, Caldini G, Moretti M, Trotta F, Pasquini R, Cenci G. Modulatory activity of a *Lactobacillus casei* strain on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity in rats. *Environ Mol Mutagen*, 2008, 49: 192-199.
162. Cao L, Yang XJ, Li ZJ, Sun FF, Wu XH, Yao JH. Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.20291. *Poult Sci*, 2012, 91: 3065-3071.
163. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 316.

164. Daisley BA, Trinder M, McDowell TW, Welle H, Dube JS, Ali SN, Leong HS, Sumarah MW, Reid G. Neonicotinoid-induced pathogen susceptibility is mitigated by *Lactobacillus plantarum* immune stimulation in a *Drosophila melanogaster* model. *Sci Rep*, 2017, 7: 2703.
165. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest*, 2015, 6.
166. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science health Part C*, 2009, 27: 120-139.
167. Lyubimova N, Timofeiev Y, Sushlinskii N. The glio-fibrillar acid protein in blood serum of patients with brain tumors and neurological diseases of non-tumorous etiology. *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika*, 2016, 61: 466-469.
168. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochemical research*, 2000, 25: 1439-1451.
169. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters*, 2014, 565: 7-13.
170. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Science*, 1997, 6: 929-955.
171. Bretveld RW, Thomas CM, Scheepers PT, Zielhuis GA, Roeleveld N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 30.
172. McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev*, 2001, 22: 319-341.
173. Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, Manuweera G, Buckley NA. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med*, 2010, 7: e1000357.

174. Bhardwaj S, Srivastava M, Kapoor U, Srivastava L. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food chemical toxicology*, 2010, 48: 1185-1190.
175. Mondal S, Mukhopadhyay S, Kumar S, Mandal P, Pradhan S, Biswas S, Purohit K. Haematobiochemical profile in chronic acetamiprid exposure in Sprague Dawley rats. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 2015, 3: 384-394.
176. Sudha MR. Safety assessment studies of probiotic *Saccharomyces boulardii* strain Unique 28 in Sprague-Dawley rats. *Beneficial microbes*, 2011, 2: 221-227.
177. Bagri P, Kumar V, Sikka AK, Punia JS. Preliminary acute toxicity study on imidacloprid in Swiss albino mice. *Veterinary World*, 2013, 6: 955.
178. Abbassy MA, Marzouk MA, Nasr HM, Mansy AS, Affairs P. Effect of imidacloprid and tetraconazole on various hematological and biochemical parameters in male albino rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Political Sciences*, 2014, 2: 122.
179. Vohra P, Khera KS, Sangha GK. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2014, 110: 50-56.
180. Mondal S, Ghosh R, Mate M, Karmakar D In *Effects of acetamiprid on immune system in female Wistar rats*, Proceedings of the Zoological Society, (editör).^(editörler). Springer: 2009; 109-117.
181. Shi X, Dick RA, Ford KA, Casida JE. Enzymes and inhibitors in neonicotinoid insecticide metabolism. *Journal of agricultural food chemistry*, 2009, 57: 4861-4866.
182. Ford KA, Casida JE. Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. *Chemical research in toxicology*, 2006, 19: 944-951.

183. Ford KA, Casida JE. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chemical research in toxicology*, 2006, 19: 1549-1556.
184. Devan RS, Mishra A, Prabu P, Mandal T, Panchapakesan S. Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. *Toxicological Environmental Chemistry*, 2015, 97: 1236-1252.
185. Yi-Wang J-JZ, Xiang H-Y, Jia-Hua Z, Wang X-Z. Acetamiprid residues in male mice and its effect on liver function. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 2012, 11: 2706-2710.
186. Condette CJ, Khorsi-Cauet H, Morlière P, Zabijak L, Reygnier J, Bach V, Gay-Quéheillard J. Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One*, 2014, 9: e102217.
187. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clinical Gastroenterology hepatology*, 2013, 11: 1075-1083.
188. Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 316.
189. Qin H, Zhang Z, Hang X, Jiang Y. *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC microbiology*, 2009, 9: 63.
190. Sentürk N. Cutaneous inflammation. 2013, 47: 28-36.
191. Duzguner V, Erdogan S. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2012, 104: 58-64.

192. Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, Hornova M, Srutkova D, Hudcovic T, Ridl J. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One*, 2011, 6: e27961.
193. Alkan R. Probiyotik maya: *Saccharomyces boulardii*. *Tünav Bilim Dergisi*, 2012, 5: 13-16.
194. Enaud R, Vandeborghet L-E, Coron N, Bazin T, Prevel R, Schaefferbeke T, Berger P, Fayon M, Lamireau T, Delhaes L. The mycobiome: a neglected component in the microbiota-gut-brain axis. *Microorganisms*, 2018, 6: 22.
195. Thomas S, Metzke D, Schmitz J, Dörffel Y, Baumgart DC. Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, 2011, 301: G1083-G1092.
196. Ertör O. *Saccharomyces boulardii*: İnfeksiyöz ishal tedavisinde yeni bir seçenek mi. *Klinik Dergisi*, 2003, 16: 3-7.
197. Everard A, Matamoros S, Geurts L, Delzenne NM, Cani PD. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. *MBio*, 2014, 5: e01011-01014.
198. Zhang Y-H, Xu D, Liu J-Q, Zhao X-H. Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production. *Food chemistry*, 2014, 164: 173-178.

199. Zhou XW, Zhao XH. Susceptibility of nine organophosphorus pesticides in skimmed milk towards inoculated lactic acid bacteria and yogurt starters. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2015, 95: 260-266.
200. Đorđević T, Šiler-Marinković S, Đurović-Pejčev R, Dimitrijević-Branković S, Gajić Umiljendić J. Dissipation of pirimiphos-methyl during wheat fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *Letters in applied microbiology*, 2013, 57: 412-419.
201. Islam SMA, Math RK, Cho KM, Lim WJ, Hong SY, Kim JM, Yun MG, Cho JJ, Yun HD. Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *Journal of agricultural food chemistry*, 2010, 58: 5380-5386.
202. Liu Z, Dai Y, Huan Y, Liu Z, Sun L, Zhou Q, Zhang W, Sang Q, Wei H, Yuan S. Different utilizable substrates have different effects on cometabolic fate of imidacloprid in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Applied microbiology biotechnology*, 2013, 97: 6537-6547.
203. Shamloo HB, Golkari S, Faghfoori Z, Movassaghpour A, Lotfi H, Barzegari A, Khosroushahi AYJApb. *Lactobacillus Casei* decreases organophosphorus pesticide diazinon cytotoxicity in human HUVEC cell line. 2016, 6: 201.
204. Hamdy H. *Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Evaluation after Repeated Dose of Acetamiprid in Albino Rats*. Baskı. 2016.
205. Zhang J, Wang Y, Xiang H, Wang X. Nephrotoxicity of acetamiprid on male mice and the rescue role of vitamin E. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 2012, 11: 2721-2726.
206. Rasgele P, Oktay M, Kekecoglu M, Muranlı F. The histopathological investigation of liver in experimental animals after short-term exposures to pesticides. *Bulg. J. Agric. Sci*, 2015, 21: 446-453.

207. Arfat Y, Mahmood N, Tahir MU, Rashid M, Anjum S, Zhao F, Li D-J, Sun Y-L, Hu L, Zhihao C. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology reports*, 2014, 1: 554-561.
208. Duzguner V, Erdogan S. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2010, 97: 13-18.
209. Abd-Elhakim YM, Mohammed HH, Mohamed WA. Imidacloprid Impacts on Neurobehavioral Performance, Oxidative Stress, and Apoptotic Events in the Brain of Adolescent and Adult Rats. *Journal of agricultural food chemistry*, 2018, 66: 13513-13524.
210. Dhouib IB, Annabi A, Doghri R, Rejeb I, Dallagi Y, Bdiri Y, Lasram MM, Elgaaied A, Marrakchi R, Fazaa S. Neuroprotective effects of curcumin against acetamiprid-induced neurotoxicity and oxidative stress in the developing male rat cerebellum: biochemical, histological, and behavioral changes. *Environmental Science Pollution Research*, 2017, 24: 27515-27524.
211. Abou-Donia MB, Goldstein LB, Bullman S, Tu T, Khan WA, Dechkovskaia AM, Abdel-Rahman AA. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of Toxicology Environmental Health, Part A*, 2008, 71: 119-130.
212. Li P, Ann J, Akk G. Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. *Journal of neuroscience research*, 2011, 89: 1295-1301.
213. Güner UM, Fulya Dilek G. Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 2013, 3: 103-114.

214. Feng S, Kong Z, Wang X, Peng P, Zeng EY. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2005, 61: 239-246.
215. Costa C, Silvari V, Melchini A, Catania S, Heffron J, Trovato A, De Pasquale R. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, 2009, 672: 40-44.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Çiğdem SEVİM
Doğum tarihi:	07 Ocak 1985
Doğum Yeri:	Osmangazi/Bursa
Medeni Hali:	Bekâr
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji
Tel:	0536 313 14 02
Faks:	-
E-mail:	cigdem.sevim@atauni.edu.tr
Eğitim	
Lise:	Bursa Erkek Lisesi
Lisans:	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler
Yüksek lisans:	Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Ens, Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı (2015)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
	Türk Farmakoloji Derneği Türk Toksikoloji Derneği
İlgi Alanları ve Hobiler	
	Keman, tiyatro, şan

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Doç.Dr.Erol AKPINAR* danışmanlığında sunulan “Probiyotiklerin Kronik Neonikotinoid (Acetamiprid, İmidacloprid) Toksikitesi Üzerine Etkilerinin Ratlarda Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	14	15
Genel Bilgiler	2	30
Materyal ve Metod	15	35
Bulgular	9	10
Tartışma	2	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 21 / 06 / 2019

Öğrenci Adı-Soyadı

İmza

Çiğdem SEVİM

Danışman Adı-Soyadı

İmza

Doç.Dr.Erol AKPINAR

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1700334739
Konu : HADYEK Kararı.

04.12.2017

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 30.11.2017 tarihli ve 42190979-000-E.1700332023 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazımız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.11.2017 tarih ve 13 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 179 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 30.11.2017

Toplantı Sayısı : 13

KARAR NO 179: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Erol AKPINAR'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Probiyotiklerin Kronik Neonikotinoid (Acetamiprid, Imidacioprid) Toksisitesi Üzerine Etkilerinin Ratlarda Araştırılması**" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 30.11.2017 tarih ve 42190979-000-E.1700332023 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Bu Belge Elektronik İmzalı

Aşlı İle Aynıdır
:20.1.06.120.19

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı


Mehmet KOCA

Şcf

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubvs.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=8204471>