



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PATOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**SIÇAN PRİMER KARACİĞER HÜCRE KÜLTÜRÜ  
ÜZERİNE DELTAMETRİNİN APOPTOTİK VE OKSİDATİF  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ayhan GACAR**

**Samsun**

**Haziran-2016**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PATOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**SIÇAN PRİMER KARACİĞER HÜCRE KÜLTÜRÜ  
ÜZERİNE DELTAMETRİNİN APOPTOTİK VE OKSİDATİF  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ayhan GACAR**

**Danışman**

**Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ**

**Samsun**

**Haziran-2016**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ayhan GACAR tarafından Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ Danışmanlığında hazırlanan “Sıçan Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Deltametrinin Apoptotik ve Oksidatif Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 03 /06 /2016 tarihinde yapılan sınav ile Patoloji (Veteriner) Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.M.Yavuz GÜLBAHAR, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr.Tolga GÜVENÇ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr.Zafer YAZICI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof.Dr.Oğuz KUL, Kırıkkale Üniversitesi

Üye : Doç.Dr.Funda YILDIRIM, İstanbul Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

(İmza Boşluğu, 2 satır)  
Unvanı Adı SOYADI  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca tecrübe ve birikimlerinden faydalandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ başta olmak üzere, Patoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Yavuz GÜLBAHAR'a, Prof. Dr. Murat YARIM'a, Prof. Dr. Mahmut SÖZMEN'e, hücre kültürlerinin elde edilmesi aşamasında verdiği teknik ve manevi destekten dolayı Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zafer YAZICI'ya, istatistiki çalışmalara verdiği destekten dolayı Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Serhan Serhat AY'a,

Patoloji Anabilim Dalı bünyesinde geçirdiğim güzel günlerde ve yapmış olduğumuz çalışmalar sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana kardeşleri gibi davranan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Yonca Betil KABAK'a ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. M. Önder KARAYİĞİT'e,

Ayrıca beni dünyaya getiren, büyüten, yetiştiren ve benim için her türlü fedakarlığa katlanan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.11.006 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

**ÖZET**  
**SIÇAN PRİMER KARACİĞER HÜCRE KÜLTÜRÜ ÜZERİNE**  
**DELTAMETRİNİN APOPTOTİK VE OKSİDATİF ETKİLERİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**Amaç:** Deltametrin, tarım alanında ve Veteriner Hekimliğinde çeşitli preparatlar halinde sık olarak kullanılan piretroit insektisittir ve metabolizmasında karaciğer etkin bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada deltametrinin *in vitro* olarak hepatositler üzerinde apoptotik ve oksidatif etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmanın ana materyalini kollejenaz perfüzyon tekniği ile elde edilen primer karaciğer hücre kültürü oluşturmaktadır. Hepatositlere 24, 48 ve 72 saat boyunca 1, 10, 100 µM konsantrasyonun deltametrin uygulandı. Hücreler üzerinde deltametrinin apoptotik etkilerinin incelenmesi amacıyla immunositokimyasal metotla caspase 3, caspase 8 ve caspase 9 aktivitesi ve TUNEL reaksiyonu, oksidatif etkilerinin incelenmesi amacıyla ise hem immunositokimyasal olarak hem de Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılarak ilgili Süperoksit Dizmutaz 1, Süperoksit Dizmutaz 2 ve Glutatyon Peroksidaz 1 aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Deltametrinin primer karaciğer hücre kültürü üzerine hem apoptotik hem de oksidatif etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Buna karşın farklı zamanlarda ve farklı dozlarda deltametrine maruz kalan hücreler arasında apoptotik mekanizmada rol oynayan caspase 3, caspase 8, caspase 9 ve oksidatif mekanizmada rol oynayan SOD 1, SOD 2 ve GPx 1 ekspresyon seviyeleri arasında doz ve zamanla ilişkili istatistiksel olarak anlamlı bulgular elde edilmemiştir.

**Sonuç:** Deltametrinin primer karaciğer hücre kültürü üzerinde oksidatif ve apoptotik etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Karaciğer hücrelerinin deltametrin toksikasyonunda olası oksidatif reaksiyonlar ve meydana gelen apoptotik süreç arasındaki ilişki açığa çıkarılmaya çalışılmış olmakla birlikte, söz konusu mekanizmalar arasında gerçekleşen etkileşimler üzerine çok sayıda çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis; deltametrin; oksidatif stres; primer karaciğer hücre kültürü

**Ayhan GACAR, Doktora Tezi**  
**Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2016**

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF APOPTOTIC AND OXIDATIVE EFFECTS OF DELTAMETHRINE ON PRIMARY CELL CULTURE OF RAT HEPATOCYTES

**Aim:** Deltamethrin is a pyrethroid insecticide commonly used in various preparations in agriculture and Veterinary Medicine and liver plays an active role in its metabolism. In this *in vitro* study it was aimed to investigate the apoptotic and oxidative effects of deltamethrin on hepatocytes.

**Material and Method:** The main material of the study is primary hepatocyte culture obtained by the enzyme collagenase perfusion technique. 1, 10, 100  $\mu$ M concentrations of deltamethrin was applied for 24, 48 and 72 hours to the hepatocytes. For the investigation of the apoptotic effects on cells of deltamethrin, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 and TUNEL activity was determined immunocytochemically. To examine the effects of oxidative effects of deltamethrin on cells, datas of SOD 1, SOD 2 and GPx 1 enzymes obtained from immunocytochemical evaluations and Real Time Polymerase Chain Reaction analysis were compared.

**Results:** Oxidative and apoptotic effects of deltamethrin on primary hepatocyte cultures cells was demonstrated. However statistically dose and time-related significant findings could not be obtained from the data of apoptotic mechanisms involved in caspase 3, caspase 8, caspase 9 and oxidative mechanisms involved in SOD 1, SOD 2 and GPx 1 expression levels in primary hepatocyte cultures exposed different doses of deltamethrin for different time.

**Conclusion:** The oxidative and apoptotic effects of deltamethrin on primary hepatocyte culture cells has been demonstrated. Although relationship between potential oxidative reactions and apoptotic processes occurring in deltamethrin toxications of liver cells have tried to uncover, many studies must be done to understand the interactions that occur between these mechanisms.

**Keywords:** Apoptosis; deltamethrin; oxidative stress; primary hepatocyte cell culture

Ayhan GACAR, PhD Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June – 2016

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
ALT	Alanin aminotransferaz
Apaf	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
AST	Aspartat aminotransferaz
BCL	B-hücre lenfoması
BSA	Sığır serum albümini
CAD	Kaspaz aktiviteli DNAaz
Caspase	Sistein aspartat proteazlar
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas ile ilişkili ölüm domaini
FasL	Fas ligand
FBS	Fötal sığır serumu
FRET	Floresan Rezonans Enerji Kaynağı
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMM	Hepatosit minimal medyumu
IAPs	Apoptozun fizyolojik inhibitörleri
ICAD	Kaspaz aktiviteli DNAaz inhibitörü
MDA	Malondialdehit

MDCK	Madine Darby Canine Kidney
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MPTP	Mitochondrial permeability transition pores
mRNA	Messenger RNA
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit anyonu
OH	Hidroksil radikali
PBA	3-fenoksibenzoik asit
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonükleik asit
ROS, ROT	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Rt- PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SABK	StreptAvidin Biotin Peroksidaz Kompleks
SOD	Süperoksit dizmutaz
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferaz
TNF	Tümör nekrozis faktör
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptörü
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling
µM	Mikromolar



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1. Pestisitlerle İlgili Genel Bilgiler .....	2
2.2. Deltametrinin Genel Özellikleri ve Toksikokinetiği .....	3
2.2.1. Deltametrinin Neden Olduğu Nörotoksisite .....	5
2.2.2. Deltametrinin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkisi .....	7
2.2.3. Deltametrinin Neden Olduğu Nefrotoksisite .....	8
2.2.4. Deltametrinin Üreme Sistemi Üzerine Etkileri .....	8
2.2.5. Deltametrinin Diğer Sistemler Üzerine Etkileri .....	9
2.3. Hepatositlerin Özellikleri ve Biyotransformasyon .....	10
2.4. Deltametrinin Neden Olduğu Hepatotoksisite Mekanizması .....	12
2.4.1. Deltametrinin Neden Olduğu Oksidatif Stres .....	13
2.4.1.1. Süperoksit Dizmutaz (SOD) .....	17
2.4.1.2. Glutatyon Peroksidazlar (GSH-Px) .....	19
2.4.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları .....	20
2.4.2.1. Nekrotik Hücre Ölümü .....	20
2.4.2.2. Apoptotik Hücre Ölümü .....	20
2.4.2.3. Otofajik Hücre Ölümü .....	27
2.4.3. Oksidatif Stres ve Apoptozis .....	28
2.5. Primer Karaciğer Hücre Kültürü .....	29
<b>3. MATERYAL METOT</b> .....	32
3.1. Hepatosit İzolasyonu İçin Kullanılan Sıçanlar .....	32
3.2. Primer Karaciğer Hücre Kültürünün Elde Edilmesi ve Toksikasyon .....	32
3.2.1. Kullanılan Medyumlar ve Ekipmanlar .....	33
3.2.2. Hepatosit İzolasyonu İçin Uygulanan Protokol .....	33
3.2.3. Sıçan Kuyruk Kollejeni ile Flask ve Plate Yüzeylerinin Kaplanması .....	35
3.2.4. Çalışma Grupları ve Toksikasyon .....	35
3.3. İmmünohistokimyasal İnceleme .....	36

3.3.1. İmmünositokimyasal Tekniğın Uygulanması.....	36
3.3.2. Hepatositlerdeki Apoptozisin Belirlenmesi.....	37
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
3.4.1. Total RNA'nın İzolasyonu.....	38
3.4.2. cDNA (komplementer DNA) Sentezi.....	39
3.4.3. Referans Gen (Housekeeping Gen).....	40
3.4.4. Primer Proplar.....	41
3.4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü.....	41
3.4.5.1. Master Mix'in Hazırlanması.....	41
3.4.5.2. PZR Karışımının Hazırlanması (PZR Mix).....	42
3.4.5.3. LightCycler Karosele Dayalı Sistemin Protokolü.....	42
3.4.6. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Elde Edilmesi.....	43
3.5. Birim Alana Düşen Hücre Sayısının Belirlenmesi.....	44
3.6. İstatistiksel Analiz.....	44
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>45</b>
4.1. Deltamerinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Apoptotik Etkisinin İncelenmesi.....	45
4.1.1. Caspase 3 Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	45
4.1.2. Caspase 8 Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	47
4.1.3. Caspase 9 Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	49
4.1.4. TUNEL Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	50
4.2. Deltamerinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Oksidatif Etkilerinin İncelenmesi.....	52
4.2.1. Süperoksit Dismutaz 1 (SOD 1) Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	53
4.2.2. Süperoksit Dismutaz 2 (SOD 2) Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	54
4.2.3. Glutatyon Peroksidaz 1 (GPx 1) Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	56
4.3. Birim Alana Düşen Hücre Sayıları.....	61
4.4. Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları.....	62
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>64</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>74</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>86</b>

## 1. GİRİŞ

*Chrysanthemum cinerariaefolium* çiçeğinden elde edilen pestisitler özellikle tarım alanında ve veteriner hekimliğinde yoğun olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitler çevremizde amaçsız, sınırsız, nerede ise kontrolsüz olarak atılan birkaç toksik kimyasal madde gruplarından birisidir. Pestisitler hemen her türlü ögede bulunmaktadır. Havada, suda, toprakta, yağmurda, karda, buzda, yüzeysel sularda ve siste bile bulunabilmektedirler. Tip 2 piretroit insektisit olan deltametrin Veteriner Hekimliği alanında da çeşitli preparatlar halinde yoğun şekilde kullanılmaktadır.

Böcekler için oldukça toksik ve öldürücü etki gösteren deltametrinin memelilerdeki toksik etkisi oldukça düşüktür. Memelilerde özellikle sinir sistemi, üriner sistem ve genital sistem üzerinde yoğunlaşmış çalışmalar mevcut olmakla birlikte, ksenobiyotik mekanizmasında temel rol oynadığı bilinen karaciğer üzerinde deltametrinin etkilerine yönelik çalışmalar daha kısıtlı sayıda bulunmaktadır.

Yapılacak olan araştırmada ksenobiyotik metabolizması üzerinde etkili olduğu bilinen karaciğer hücreleri üzerinde deltametrinin neden olduğu apoptotik ve oksidatif mekanizmalar ve bu mekanizmaların birbirleriyle olan etkileşimleri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Piretroit insektisit toksikasyonunda hücreler tarafından birçok reaksiyonun başlatılmasından sorumlu tutulan reaktif oksijen türlerine karşı hücrelerin gösterdiği tepkiler, antioksidant enzimler olan süperoksit dismutaz enzimleri (SOD 1 ve SOD 2) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitelerine bakılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Oksidatif stresin neden olduğu apoptotik mekanizmanın uyarılmasında ve aktivasyonunda rol oynayan caspase 3, caspase 8, caspase 9 gibi enzimlerle, apoptozisin varlığına işaret eden TUNEL analizi kullanılarak söz konusu mekanizmanın nasıl uyarıldığı konusunda bilgi elde edilmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pestisitler İle İlgili Genel Bilgiler

Pestisit terimi kısaca, pest (haşarat) adı verilen zararlıları öldürmek amacı ile kullanılan madde anlamına gelir. İnsan, hayvan ve bitki üzerinde, çevresinde bulunan veya yaşayan, ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerini azaltan, hasara uğratan zararlıları öldürmek için kullanılan kimyasallardır. Bu zararlılar, çeşitli hastalıkları taşıyan parazitler, tarım ve bitki zararlısı böcekler, yabancı ot ve mantarlar, insan, hayvan, çevre ve barınaklardaki sinek, bit, pire, kene, uyuz, hamam böceği gibi uçan ve yürüyen canlılardır (Kaya ve ark., 2002).

Tip I piretiroid pestisit olan allethrin ilk olarak 1949 yılında bulunmuştur. İnsektisit kullanımının çevrede oluşturabileceği risklerle ilgili ilk endişeler ve araştırmalar sentetik pestisitlerin keşfiyle beraber bu yıllarda başlamıştır. Daha sonra diğer tip I piretiroid pestisitlerden olan tetrametrin (1968) ve permetrinin (1973) bulunmasıyla birlikte özellikle tarım alanında yoğun şekilde kullanılmaya başlanmışlardır (Öztürk, 1990). Bu tarihten itibaren özellikle tarımsal alanda pestisit kullanımı yıldan yıla artmaktadır. Pestisitlerin sadece hedef seçilen zararlılara etkili olması arzu edilir. Fakat pestisitler imalat, depolama, pazarlama ve kullanılma sırasında hava, su ve toprağa karışarak hedef olmayan canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Buna bir de bilinçsiz ve dikkatsiz kullanım da eklenirse suda, toprakta, bitkisel ve hayvansal besinlerde artan oranlarda birikirler (Şanlı, 1984). Pestisitler çevremizde amaçsız, sınırsız, nerede ise kontrolsüz olarak atılan birkaç toksik kimyasal grubundan birisidir. Pestisitler hemen her türlü öğede bulunmaktadır. Havada, suda, toprakta, yağmurda, karda, buzda, yüzeysel sularda ve siste bile bulunabilmektedirler. Dünyadaki bütün canlılar, bitkiler, hayvanlar pestisitlerden etkilenirler (Last ve Wallace , 1992).

Pestisitler içerdikleri etkili kimyasallara göre gruplandırılabilirler. Pestisitler kimyasal yapılarına göre inorganik pestisitler, doğal organik pestisitler ve sentetik organik pestisitler olmak üzere üç grupta incelenirler. Piretroitler, doğal piretrin temel alınarak hazırlanan sentetik maddelerdir. Piretrin insektisitler doğal olarak *Chrysanthemum cinerariaefolium* çiçeğinden ekstrakte edilir. Bu çiçekten elde edilen piretrinler ilk olarak 1800'lü yıllarda Çin'de kene, karasinek ve sivrisineklere karşı mücadelede kullanılmıştır. Elde edilen bu öz piretrum olarak da adlandırılır. Piretrumda

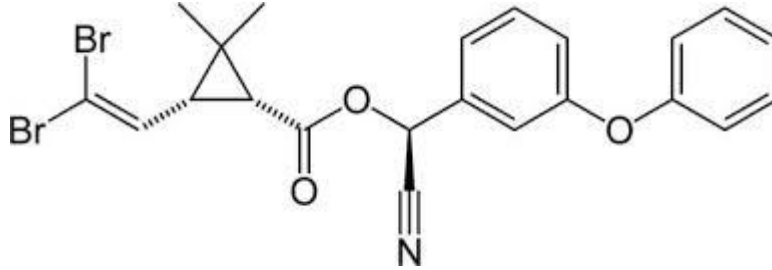
jasmolin I ve II, sinerin I ve II, piretrin I ve II isimli etkin maddeler bulunur. Piretrin ve piretrum insan ve diğer memelilerde hızlı bir şekilde metabolize olur ve atılır. Bu sayede memeliler için son derece güvenli olan bu doğal bileşikler, ışık ve ısı karşısında dayanıksızdırlar (Williams ve ark., 2000). Piretroidler, piretrin benzeri anlamındadır ve kimyasal olarak üretilmiş maddelerdir. 1960'lı yıllarda piretroidler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu piretrum ekstraktlarının yerini sentetik piretroidler almıştır (Katsuda, 1999). Bu yeni geliştirilmiş olan piretroidler, piretrumla karşılaştırıldığında hem insektisidal aktivitesi hem de ışık altındaki dayanıklılığı artırılmıştır. Piretrinlerle karşılaştırıldığında böceklerle ve insanlara karşı daha toksiktirler ve doğadaki yıkımlanma süreleri daha uzundur. Piretrinlerin ve piretroidlerin insektisidal aktivitelerini arttırmak için genellikle sinerjistik etkili maddeler ile birleştirilirler. Bu sinerjistik maddeler piretrinlerin veya piretroidlerin yıkımlanmasını sağlayan enzimleri baskılayarak toksisitelerini arttırmaktadır (U.S. Department of Health And Human Services, 2003).

Sentetik piretroidler birçok farklı formülasyon altında büyük ve küçük hayvanlarda önemli hastalıklara neden olan ektoparazitlere karşı mücadelede damla, sprey, toz, daldırma, şampuan ve aerosol gibi birçok farklı uygulama biçiminde kullanılmaktadır. Bu uygulamalar sırasında zehirlenme vakalarına rastlansa da, Veteriner Hekimliğinde en çok toksikasyon durumları dermal maruziyeti takiben oluşmaktadır. İnsanlarda ise oral, dermal, inhalasyon yoluyla oluşmuş toksikasyon vakaları bulunmaktadır (U.S. Department of Health And Human Services, 2003).

## **2.2. Deltametrinin Genel Özellikleri ve Toksikokinetiği**

Deltametrin ((S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl, (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate)(şekil 1) dünyada en yaygın ve çok kullanılan insektisitlerden biridir ve deltametrin pestisitlerin içinde en güvenli olarak bilinen sentetik piretroid pestisitler içinde yer alır. Çok uzun süredir kullanılmalarına rağmen piretroid toksikasyonu, özellikle deltametrine bağlı toksikasyon durumları nadir olarak meydana gelir. Sentetik piretroidlerin insektisidal aktivitesini arttırmak için yapılarına cyano grubu eklenir. Oluşan bu  $\alpha$  cyano grup tip II piretroidler, lipofilik özellikte olup suda çözünmezler. Bu özellik tip II piretroidlerin hava, ışık vs gibi fiziksel çevreden etkilenmelerini engelleyerek yüksek miktarda bozulmadan uzun süre dayanmasına neden olmaktadır. Deltametrin böcekleri sindirim yoluyla ya da temas sonrası etkileyen

bir insektisittir. Deltametrinin lipofilik özelliğe olması böceklerin ve akarların kutikulasını kolay bir şekilde geçmesine neden olmaktadır. Bütün bu özellikler bu pestisitlerin insektisidal etkilerini artırmaktadır ( US Department of Health and Human Services, 2003).



Şekil 1. Deltametrinin kimyasal yapısı (Anonim, 2016)

Yapılan hayvan deneylerinde piretroidlerin deri yoluyla alındıktan sonra intradermal metabolizması sonucunda sistemik dolaşıma çok az miktarda geçtiği gözlenmiştir (Bast ve ark. 1997). Bununla birlikte oral olarak alınan deltametrinin kandaki ana bileşiklerine ya da metabolitlerine bakılarak yapılan incelemelerde, alınan dozun %14-70 arasında plazmaya geçtiği saptanmıştır. Sıçanlarda oral yolla tek doz uygulanan deltametrinin 2.1 saat sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaştığı gözlenmiştir. Dolaşımdaki deltametrinin tüm sinir sistemi dokularında ve beynin çalışılan kısımlarında varlığı tespit edilmiştir (PesticideResidues in Food, 2000). Kandaki yarılanma süresi 5.5 saattir. Deltametrin lipofilik özelliğinden dolayı birkez emildikten sonra hızlı bir şekilde dolaşıma geçmektedir. Ayrıca sahip oldukları lipofilik özellikleri başta merkezi sinir sistemi (MSS) dokuları olmak üzere birçok dokuya deltametrinin dağılımını kolaylaştırmaktadır (Anadon ve ark., 1996).

Yapısal farklar olmakla birlikte piretrin ve piretroidlerin birçok memeli türünde yıkımlanmasında etkili metabolik yolak benzer özellik göstermektedir. Özellikle piretrin ve piretroidler gastrointestinal sistemde hızlı şekilde hidrolize olabilirler ve esas olarak idrarla atılan metabolitlerin olduğu konjugasyon reaksiyonu, metil grupları ve aromatik karbonların oksidasyonu, ester bağlarının hidrolizini içeren mekanizmalar sonucunda hızlıca metabolize olmaktadır. Erkek sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada oral yolla 0.64 – 1.6 mg/kg vücut ağırlığı dozunda deltametrine maruz kaldıklarında yapısında bulunan asit, alkol ve siyano grubundaki moleküllerin oluşturduğu farklı metabolitlerin açığa çıktığı gözlenmiştir (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use Deltamethrin Summary Report 4). Oral ya da intraperitoneal yolla

alınan deltametrinin açığı çıkan en belirgin metaboliti tiyosiyanattır. Diğer oluşan metabolitler ise PBA (3-fenoksibenzoik asit), 4'-OH-PB acidsulfate (4'-hydroxy-3-phenoxybenzoic acidsulfate), Br<sub>2</sub>CA(3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethyl cyclo propane carboxylic acid) (PesticideResidues in Food 2000). Metabolizmalarında bazı stereospesifite bulunmaktadır. Trans-izomer yapıda olanlar cis-izomerlerle karşılaştırıldığında daha hızlı hidrolize olurlar bu nedenle oksidasyon daha önemli bir metabolik yolak olarak görev alır. Bu metabolik yollar sinir dokusunda meydana gelebildiği gibi karaciğer, böbrek ve diğer organlarda da gerçekleşebilmektedir. Ester bağlarının parçalanması toksisitenin önemli derecede azalmasına neden olur (U.S. Department of Health And Human Services, 2003).

Deltametrin diğer piretroidlerle karşılaştırıldığında değişik klinik semptomların oluşmasına neden olabilmektedir. İnsanlarda zehirlenme sonrasında oluşan semptomlar; ataksi, kas titremelerine sebep olan konvulziyonlar ve paralizler, dermatitis, ödem, diyare, dispnea, baş ağrısı, karaciğer mikrozomal enzimlerinin uyarılması, irritabilite, periferel dolaşımın çökmesi, rinore, serum alkalik fosfataz seviyesinde artış, titremeler, kusma ve solunum yetmezliğine bağlı ölümdür. Memeliler deltametrine maruz kaldıklarında kıvrınma sendromu olarak nitelendirilen tip 2 motor semptomlar açığa çıkarılırlar ve sıçanlarda bunlara ek olarak aşırı salivasyon dikkat çekicidir. Kronik piretroid insektisit toksikasyonuna bağlı şekillenmiş motor nöron hasarı veya motor nöron hastalıkları bildirilmemiştir. Ancak 2011 yılında piretroid ve organoklorin içeren çok miktarda pestisit oral yoldan alarak zehirlenen bir Japon kadında motor nöron ölümü patolojik olarak kanıtlanıp yayınlanmıştır (Doi ve ark., 2006).

### **2.2.1. Deltametrinin Neden Olduğu Nörotoksisite**

Piretroidler uyarılma süresini uzatan primer sodyum kanalı toksindir ancak MSS üzerine sitotoksik etkileri çok azdır veya yoktur. Tüm piretroidlerin etki oluşturduğu temel bölge voltaja bağımlı sodyum kanallarıdır. Bununla birlikte voltaj kapılı klorid kanalı (Farag ve ark., 2007), GABA kapılı klorid kanalı (Spencer ve O'Malley, 2006) ve protein fosforilasyonunu (Bradberry ve ark., 2005) içeren diğer potansiyel etkileşim alanları da açığa çıkmaktadır. Sodyum kanallarının uyarılabilirlik derecesi dozla ilişkilidir ancak uyarılabilirliğin doğası sodyum kanallarının yapısıyla ilişkilidir (Kulkarni ve Hodgson, 1980). Piretrinler ve piretroidler sodyum kanallarının açılmasını ve kapanmasını yavaşlattıkları için hücrenin sürekli uyarı halinde kalmasına

sebepler olurlar (Maraban ve ark., 1989). Sodyum kanallarındaki artan sodyum miktarı hücrenin stabil ve sürekli uyarılan bir halde kalmasına neden olur. Sodyum aksiyon potansiyelinin süresi tip II piretroit insektisitlerde tip I piretroitlerle karşılaştırıldığında daha uzundur. Sensorik sinir sonlarında piretroitlerin direkt etkisi sonucunda parestezi oluşur. Sinir tellerinde sürekli tekrarlayan uyarılar şekillenir. Sinirsel semptomların açığa çıkabilmesi için sodyum kanallarının en az %1'i etkilenmelidir (Bloomquist ve ark., 1986). Piretrinler ayrıca voltaj bağımlı klorid kanallarını da etkilemektedirler. Bu kanallar beyin, sinir, kas ve tükürük bezi dokusunda bulunur ve hücrenin uyarılmasını kontrol etmektedirler. Sodyum kanalları ile karşılaştırıldığında fonksiyonel olarak farklı çok sayıda klorid kanalı bulunmaktadır. Bu kanallar üzerinde piretroitler tarafından oluşturulan etkiler çok farklı nedenlerden dolayı memeli ve böcekler arasında farklılık göstermektedir. Piretroitlerin düşük vücut ısısında sodyum kanallarına bağlanması daha kuvvetli olmaktadır. Memelilerin vücut ısısı yaklaşık 37 C<sup>0</sup> olmasına rağmen böceklerin vücut sıcaklıkları yaklaşık 25 C<sup>0</sup> dir (Gupta, 2007). Memelilerle karşılaştırıldığında böcekler üzerinde piretroitlerin 2250 kat daha toksik olduğu bildirilmektedir (Bradberry ve ark., 2005). Daha yüksek seviyede sodyum kanal duyarlılığı, düşük vücut ısısı ve daha küçük vücut ölçüsüne sahip olması nedeniyle böceklerde piretroit toksikasyonu daha fazladır (Tang ve ark., 2002). Ayrıca memelilerin dermal maruziyete daha az maruz kalması ve piretroitlerin toksik olmayan metabolitlere dönüştürülmesi sonucunda toksikasyondan daha az etkilendikleri bildirilmektedir (Bradberry ve ark., 2005).

Piretroitler böceklerde "knock down" olarak nitelendirilen bir fenomene neden olurlar. Knock down piretroitlerin öldürücü olmayan ancak hücreyi uyaran etkisi altında oluşur. Knock down piretroitlerle maruz kalınması sonucunda sodyum kanallarının sodyum iyonları seçiciliği ve normal iletimin devamı gibi normal fonksiyonlarını yerine getirmeye çalışması sonucunda meydana gelir (Narahashi, 1985). Orta seviyedeki bir dozda piretroitlere maruz kalındığında hücreler yeni bir aşırı uyarılabilirlik safhasında fonksiyon gösterebilirler. İyon kanalları içindeki sodyum miktarı sodyum pompalarının atım kapasitesini aşmadığı sürece hücre normal fonksiyonunu yerine getirebilir. Piretroitlerin aşırı konsantrasyonda olması ve hücrenin tolere edebileceğinden fazla reaksiyon göstermesi sonucu depolarizasyon şekillenir ve iletim tamamen durur. En fazla depolarizasyon dolayısıyla iletimdeki durgunluk en



uzun süre sodyum kanallarını açık tutan piretroitler tarafından sağlanabilir (Haug ve Hoffman, 1990).

### **2.2.2. Deltametrinin Asetilkolinesteraz Üzerine Etkisi**

Bir serin proteazı olan Asetilkolinesteraz (AChE) sinaptik aralıkta (iki sinir hücresi arasındaki boşluk) görev yapan bir nörotransmitter madde olan asetilkolinin (ACh) parçalanmasından sorumlu olan bir enzimdir. Böylelikle sinirsel impulslar bir sonraki sinaptik boşluğa geçebilmektedir. AChE yüksek katalitik aktiviteye sahip olan bir enzimdir ve her bir molekül AChE 25000 molekül asetilkolini bir saniye içinde parçalayabilecek özelliğe sahiptir (Quinn, 1987; Taylor ve Radic, 1990). AChE sinir ve kas, merkezi ve periferal dokular, motor ve sensorik lifler, kolinerjik ve nonkolinerjik lifler gibi iletim sistemi dokuların birçok kısmında bulunmaktadır. Nörotransmisyon sırasında sinir ucundan sinaptik boşluğa ACh salınır ve salgılanan ACh postsinaptik membrandaki ACh reseptörlerine bağlanarak iletimin bu sinir üzerine geçmesine neden olur. Ayrıca postsinaptik membranda da bulunan AChE, ACh'i hidrolize ederek sinyal geçişini sonlandırmaktadır. Serbest hale geçen kolin tekrar presinaptik sinir tarafından alınıp kolin-asetiltransferaz enzimi aracılığı ile asetil CoA ile birleştirilmesi sonucunda tekrar ACh sentezlenir (Whittaker, 1990). Kolinerjik nöronların tekrar bir iletim alabilmesi için ACh'in ACh reseptörlerinden salınması gerekir. Bu ancak sinaptik boşluktaki ACh'in çok az olması durumunda gerçekleşebilir. AChE'in baskılanması sinaptik boşlukta ACh'in birikimine neden olur ve nörotransmisyonun engellenmesiyle sonuçlanır. AChE'in geri dönüşümsüz olarak baskılanması kas paralizine, konvulziyonlara, bronşial konstriksiyona ve asfeksiye bağlı ölümün şekillenmesine neden olabilmektedir.

Hem vertebralılarda hem de vertebrasızlarda nörotransmitter bir madde olan asetilkolini hidrolize eden asetilkolinesterazın, düşük konsantrasyonlarda organofosfat, karbamat pestisit ve piretroitler tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (de la Torre ve ark., 2002). Bu nedenle bu enzim bu bileşikler için spesifik biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Guilhermino ve ark., 2000). Hossain ve ark., (2004) tarafından yapılan mikrodializ çalışmasında piretroitlerin serbest halde dolaşan sıçanlarda, hipocampusta asetinkolin salınımına etki ettiğini ve oluşan bu etkinin kolinerjik enzimde ve yüksek duyarlılıklı kolin alınımında gelişen değişimlere bağlı şekillendiği ileri sürmektedirler.

### **2.2.3. Deltametrinin Neden Olduğu Nefrotoksisite**

Deltametrine maruz kalmış hayvanların böbreklerinde şiddetli histopatolojik değişiklikler oluşabilmektedir (Shona ve ark., 2010). Deltametrin verilen albino sıçanlarda nefrotoksisite ve oksidatif stres şekillendiği gösterilmiştir (Sakr ve Al-Amoudi, 2012). Bu araştırmacılar çalışmasında renal oksidatif stresin varlığını gösteren lipid peroksidasyondaki artışı tanımlayan böbrek içeriğindeki malondialdehit (MDA) seviyesindeki artışı tespit etmişlerdir. Bununla birlikte deltametrin süperoksit dizmutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim seviyelerinde belirgin bir azalmaya sebep olmuştur. Başlıca iki anti-oksüdant enzim olan SOD ve CAT serbest radikallerin uyardığı oksidatif stresin engellenmesinde ilk basamakta yer alan enzimlerdir. SOD yüksek derecede reaktif ve potansiyel olarak toksik özellikte olan süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite katalitik dismutasyonundan ve CAT ise hidrojen peroksitin katalitik dekompozisyonu sonucu moleküler oksijene ve suya dönüşümünden sorumlu enzimlerdir (Lee ve Steinert, 2003). Böbrek dokusunda meydana gelen hasar, deltametrine maruz kalınmasından sonra böbrekteki artan lipid peroksidasyona ve azalan antioksidant enzim seviyesine bağılı olarak şekillenebileceğı ortaya atılmıştır. Deltametrin toksikasyonu oluşturulmuş sıçanların böbreklerinde tubuler dejenerasyon, glomerüler atrofi, lökosit infiltrasyonu, böbrek damarlarında konjesyon gibi birçok değişiklik histolojik incelemelerde gözlenmiştir. Ayrıca sıçanlarda serum üre ve kreatinin seviyelerindeki yükselme rapor edilmiştir (Sakr ve Al-Amoudi, 2012). Böbrekte oluşan diğere lezyonlarla birlikte serum üre ve kreatinin miktarlarındaki artış, oluşan toksikasyon sonucunda glomerüler filtrasyonun da bozulduğunun göstergesidir.

### **2.2.4. Deltametrinin Üreme Sistemi Üzerine Etkileri**

Yetişkin erkek sıçanların 65 gün boyunca 1.0 ve 2.0 mg/kg deltametrine maruz kalmaları sonucunda testis, prostat ve veziküla seminalisin ağırlığında azalma, sperm sayısı, motilitesi ve canlılığı yanında testesteron miktarında azalma ve anormal sperm oranında belirgin bir artış tespit edilmiştir (Abd El-Aziz ve ark., 1994). Testislerin ağırlıkları temel olarak farklılaşmakta olan spermatogenetik hücrelerin ağırlığı ile ilişkilidir, bu nedenle testis ağırlığındaki azalma germ hücre sayısındaki azalmaya, spermatogenezin baskılanmasına ve sterojenik enzim aktivitesine bağılı olarak değişebilmektedir (Takahashi ve Oishi, 2001). Sperm sayısındaki azalma deltametrine bağılı şekillenen kimyasal toksikasyonun neden olduğı testesteron seviyesindeki

azalmaya bağlı olarak şekillenebilir (Yoshida ve ark., 2002). Testesteron erkek eklenti bezlerinin yapısını ve fonksiyonunu sağlayabilmesi için gerekli bir hormondur ve testesteron miktarındaki azalma spermatogenezisi bozmaktadır (Broockfor ve Blake, 1997). Lipitperoksit, pestisitlerinde içinde bulunduğu çok sayıda ksenobiyotik toksikasyonunda oldukça önemli rol oynayan bir oksidatif hasar belirteçidir. Malondialdehit (MDA) lipit peroksidin stabil bir son ürünüdür ve biriken lipit peroksidasyonun indirekt gösterimi amacıyla kullanılır. Sperm plazma membranında oldukça yüksek miktarda bulunan doymamış yağ asitleri ve sitoplazmasındaki antioksidant maddelerin azlığı nedeniyle lipit peroksidasyona oldukça duyarlıdır (Aitken, 1993). Lipid peroksidasyonu, sperm DNA'sında oksidatif hasara ve membran fonksiyonundaki değişime neden olarak, spermatozoan'ın gelişiminde muhtemel belirgin bir etkisi gözlenir (Aitken, 1989). Diğer yandan, testiste hücreleri reaktif oksijen türlerinin hasarlarından koruyan, aynı zamanda spermatojenik hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynayan glutatyon da çok yoğun miktarda bulunur (Teaf ve ark., 1985). Histopatolojik incelemeler sonucunda, deltametrinin testiste dejenerasyon, büzüşme, tamamlanmamış spermatogenezis ile birlikte seminifer tubullerin organizasyonlarında bozulma, spermatogonyumların ve sertoli hücrelerinin vakuolizasyonunu içeren histopatolojik değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Bu değişiklikler muhtemelen deltametrinin uyardığı lipit peroksidasyon ve testesteron hormonu seviyesindeki azalmaya bağlı olarak şekillenmektedir. Ayrıca testis içindeki testesteron hormonunun az miktarda bulunması, germ hücrelerin seminifer tubulus epitelinden ayrılmasına neden olur ve germ hücre apoptozisini başlatarak erkeklerde infertiliteye sebep olabilir (Blanco-Rodriguez ve Martinez-Garcia, 1998).

#### **2.2.5. Deltametrinin Diğer Sistemler Üzerindeki Etkileri**

Deltametrinin genotoksik etkisi, özellikle gen mutasyonları, kromozomal sapmalar, DNA üzerine etkileri çok sayıda *in vitro* deneyde araştırılmış; elde edilen sonuçların negatif olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda deltametrinin mutajenik özellikte olmadığı tespit edilmesine rağmen, 2012 yılında Oktay ve Oya tarafından yapılan çalışmada deltametrinin toksik dozlarda farelerin somatik hücrelerinde genetik toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Swiss albino farelerde erken haftalarda deltametrinin artan dozlarıyla birlikte baskın lethal mutasyon oranında hafif derecede

bir artış gözlenirse de, daha sonraki haftalarda bu oranın düştüğü belirlenmiştir (Shukla ve Taneja, 2000).

Deltametrinin uzun süreli toksik çalışmaları sıçanlar ve fareler üzerinde yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda fareler ve sıçanlar üzerinde deltametrinin karsinojenik potansiyeli tespit edilememiştir. Her iki türde de sinir sistemi hedef organ olarak gözlenmiştir. İki yıl boyunca 0, 2, 20 veya 50 mg/kg dozda deltametrin ile beslenen sıçanlarda hiçbir karsinojenik etkiye rastlanmamıştır (Shukla ve ark., 2001).

Bir sentetik piretroit olan deltametrinin immunotoksik özelliği erkek F344 sıçanları üzerinde araştırılmıştır. Günlük olarak 5 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 28 gün boyunca deltametrin ile beslenen sıçanlarda antikor üreten dalak hücrelerinin sayısında ve doğal katil hücrelerin aktivitesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Madsen ve ark., 1996). Sürekli olarak içerisinde imiprotrin ve deltametrin bulunduran insektisitlerin solunum yoluyla alınmasına bağlı olarak akciğerlerin distal kısımlarında çeşitli immunotoksik etkilerin oluşabileceği bildirilmiştir (Emara ve Draz, 2007).

### **2.3. Hepatositlerin Özellikleri ve Biyotransformasyon**

Karaciğer dokusunun hücresel yapısını hepatositler, endotelial hücreler, satellite hücreleri, Kupffer hücreleri, karaciğer-doğal katil hücreleri (pitcells) ve safra kanalı hücreleri oluşturmaktadır. Parenkim hücresi olan hepatositler karaciğer kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Diğer karaciğer hücrelerinde karaciğer fizyopatolojisi üzerinde belirgin rolleri olmasına rağmen, hepatositler benzersiz, karmaşık ve farklı fonksiyonlar ortaya koymaktadırlar. Hepatositler, proteaz inhibitörleri ( $\alpha$ 1-antitripsin, antitrombin ve  $\alpha$ 2-makroglobulin), kan pıhtılaşma faktörleri (fibrinojen, protrombin, faktör V, VII, IX, X, vb), immunkomplekslerin ve yangının modülatörleri (komplement C3, C-reaktif protein) gibi dolaşım sistemindeki temel plazma proteinlerinin üretiminden sorumludur. Bu hücreler ayrıca kolesterol, safra asitleri, A ve D vitamini gibi esansiyel maddeler ve enerji üretiminde temel rol oynayan glikoz/glikojen ve trigliseritleri de içeren yağ asitleri üzerinde homeostatik dengeyi düzenleyici görevleri vardır. Aminoasitleri, bakır ve demir gibi metalleri ve hem ve bilirubin gibi endojen bileşikleri metabolize ederler. Ayrıca hepatositler, gıda, çevresel kirlenmeler (bitkisel, hayvansal ve mantar toksinleri, pestisitler, herbisitler, organik çözücüler, boyalar ve koruyucu maddeler, vb) ve özellikle ilaçlar gibi ksenobiyotiklerin

detoksifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu nedenle hepatositlerin fonksiyonları ilaçların farmakokinetik etkileri, yan etileri ve toksik etkilerini belirleyici rol oynamaktadır (Khan ve ark., 2006, Larson, 2008).

Normal sağlıklı yetişkin bir bireyde yüksek seviyede farklılaşmış diğer hücrelerde olduğu gibi, hepatositler de nadiren bölünürler. Fakat karaciğerin parsiyel hepatektomisi sonucunda belirgin şekilde rejenerasyon olabildiği çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çok sayıda çalışma sonucunda karaciğerin kendini yenileme sürecini destekleyen temel hücre yapısının hepatositler olduğu bununla birlikte diğer karaciğer hücrelerinin de rollerinin bulunduğu gözlemlenmiştir (Mitry ve ark., 2004). Parsiyel hepatektomi bazı şiddetli karaciğer hastalıklarının sağaltımında kullanılsa da bazen uygulamanın kendisi de karaciğer hasarına neden olabilir. Ancak karaciğer hastalıklarının en önemli etiyolojik ajanları ksenobiyotikler (amatoksinler, karbon tetraklorür, siyanidler vb.), ilaçlar (asetaminofen, izoniazid, halothan, östrojen, vs.), alkol, hepatitis (A,B,C,D,E) virusları, immün ve genetik bozukluklar sayılabilir.

Karaciğer yabancı bileşiklerin metabolizasyonunda çok etkin rol oynayan bir organdır ve genellikle bu bileşiklere maruz kalındığında sıklıkla etkilenmektedir. Hücre membranlarının lipit yapıda olması nedeniyle, suda çözünen maddelere karşı geçirgen özellikte değildir. Bu özellikteki maddelerin hücre membranlarını geçebilmeleri için hücrenin özel taşıyıcı proteinlere sahip olması gerekmektedir. Uygun taşıyıcı proteinlere sahip olan hücreler böylelikle sadece kendine uygun olan maddeleri hücre içine almakla kalmazlar ayrıca suda çözünen birçok toksinin girişini de engellemiş olur. Bu benzer paradigma hücre içinden atılması gereken suda çözünebilir maddelerin uzaklaştırılmasında aynı mekanizma ile etki göstermektedir. Ancak lipit yapıda hücre membranları yağda çözünebilir bileşiklere karşı suda çözünenlere olduğu gibi bariyer oluşturamamakta ve bu maddeler hücre içine rahatlıkla geçebilmektedirler. Bu nedenle hücre üzerinde zararlı etkileri olan yağda çözünen toksik maddelerin hücre içine geçişleri çok daha kolay olurken, bu maddelerin uzaklaştırılması da oldukça güç olmaktadır.

Ksenobiyotiklerin hepatic biyotransformasyonları sonucunda dokularda biriktiklerinde, toksik etki oluşturabilecek lipofilik maddelerin uzaklaştırılması gerekmektedir (Park ve ark., 2005; Tang, 2007). Bu süreç çoğunlukla sitokrom p450

(P450) veya flavin monoksijenaz ( faz I) enzimleri tarafından katalize edilen redoks reaksiyon aracılı moleküllerin kimyasal dönüşümleri ile sağlanmaktadır. Bunun sonucunda daha polar yapıda ve doğrudan vücuttan atılabilecek yeni metabolitler oluşur ya da oluşan bu metabolitler faz II reaksiyonları sonucunda diğer endojen bileşiklerle (glutasyon, glukuronat, sülfat) tekrar birleştirilir. Oluşan bu bileşikler daha çözülebilir yapıdadır bu nedenle lipofilik maddelerin idrarla ya da safrayla atılımı kolaylaşır. Biyotransformasyon organizma için bir çeşit kendini savunma mekanizması olsa da biyoaktivasyon sonucunda ilaçların toksik metabolitlere dönüştürme süreci hücre fonksiyonuyla karıştırılabilir ve bazı hücrel makromoleküllere karşı içsel reaktivite gösterebilir. Metabolik biyoaktivasyonun en sık karşılaşılan mekanizması, P450 sistemi vasıtasıyla uyarılıp birçok kimyasal reaksiyon (kovalent bağlanma, oksidatif stres, lipid peroksidasyon, Ca<sup>2+</sup>dengesinin bozulması ve mitokondrial hasar) tarafından polar yapıda olmayan maddelerin oksidatif dönüşümüdür. Bunun sonucunda elektrofilik ara yapılar, serbest radikallere ve aktif oksijen türleri oluşur.

#### **2.4. Deltametrinin Neden Olduğu Hepatotoksisite Mekanizması**

Birçok metabolitin yüksek konsantrasyonda biriktiği bir organ olması bakımından, karaciğer piretoit metabolizmasında da temel bir role sahiptir (Richard ve Brodie, 1985). Deltametrinin metabolik yolağında sitokrom P450 monoksijenaz enzimi başta olmak üzere birçok ksenobiyotik metabolize edici enzimin rol aldığı bilinmektedir (Catinot ve ark., 1989). Tek doz sipermetrin (25g/kg) ve fenvalerate (4.5g/kg)' e maruz kalan sıçanlarda antioksidant enzim olan süperoksit dismutazın ve katalazın aktivitesinin azaldığı ve lipid peroksidasyonu ile sonuçlandığı; eritrositlerde glutasyon (GSH) seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (Kale ve ark., 1999). Deltametrin intoksikasyonu serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (Manna ve ark., 2005). Deltametrin karaciğerde sitokrom P450 ve oksidatif yolla hidrolitik ester bağlarının ayrılması sonucu metabolize edilmektedir (Eraslan ve ark., 2007). Deltametrin karaciğer, böbrek ve akciğerde histolojik değişiklikler gözlenmektedir (Manna ve ark., 2005; Shona ve ark., 2010). Ayrıca deltametrin karaciğerde çeşitli histolojik değişikliklerle birlikte, serum alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) enzimlerinde yükselmeye ve karaciğer enzimatik aktivitesinin olumsuz şekilde etkilenmesine neden olmaktadır (Lamfon, 2011).

### 2.4.1 Deltametrinin Neden Olduğu Oksidatif Stres

Dış orbitallerinde paylaşılmamış (tek sayıda) elektron taşıyan molekül veya atomlara serbest radikal denilmektedir (Valko ve ark., 2004). Serbest radikaller oldukça kısa ömürlü ve reaktiftirler. Elektriksel olarak; pozitif, negatif ve nötral yüklere sahiptirler. Yüksek enerjili olan elektronlar çevrelerindeki diğer elektronları ayırıp, yapılarını bozmaktadır. Bu durum serbest radikalleri tehlikeli ve aynı zamanda kullanışlı kılar (Uysal, 1998). Oksidatif stres hücre yapısındaki reaktif türlerin reaksiyonları sonucunda hücre fonksiyonunda meydana gelen moleküler değişim ile oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) ve hidroksil radikali (OH) gibi oksijen bağımlı serbest radikallerden ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi oksijenden köken alan ancak radikal yapıda olmayan ürünlerden oluşur.

Tüm hücrelere herhangi bir zorlukla karşılaşmadan giren ve hücre içerisinde en çok kullanılan molekül olma özelliğine sahip olan madde moleküler oksijendir. Aerobik metabolizmaya sahip canlılar için serbest radikallerin en önemli kaynaklarından birisi oksijendir. Fakat canlı organizmasında oksijen türevinin yanı sıra karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır. Moleküler oksijen ( $O_2$ ), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Organizmada geçiş metallerini ( $Fe^{2+}$  ve  $Cu^+$  gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Negatif yüklü, pozitif yüklü veya nötral olabilen serbest radikaller dış orbital konfigürasyonunun yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik aktiviteleri göz önünde bulundurularak değerlendirilir (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşur (Cheesman ve Slater, 1993; Wu ve Cederbaum, 2003). 1. Kovalent bağların homolitik bölünmesiyle; kovalent bağlı molekülün bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalır. 2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle; radikal özelliği bulunmayan bir molekülden tek bir elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalarak radikal formu oluşturur. 3. Normal bir moleküle elektron transferiyle; radikal

özelliği bulunmayan bir molekül, tek elektron transferi ile dış orbitalinde ortaklanmamış elektron içeren radikal formuna dönüşür.

Yaşadığımız çevre koşullarında nasıl fiziksel ve kimyasal etkiler ile çeşitli radikal yapımı var ise, hücre içerisinde de ciddi ve çeşitli miktarlarda radikal üretimi söz konusudur. Organizmada serbest radikal oluşumun çeşitli kaynakları bulunmaktadır. Aktifleşmiş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler (alkol, uyuşturucu), çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasallar, pestisitler, sigara dumanı, anestezikler), stres (streste artan katekolamin sonucu katekolaminlerin oksidasyonu) gibi nedenler biyolojik kaynakları oluştururken (Akkuş, 1995), küçük moleküllerin oksidasyonu (tiyoller, hidrokarbonlar, katekolaminler, flavinler), enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, triptofan dehidrojenaz, hemoglobin), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum (ER) ve nükleer membran transport sistemi (sitokrom P450, sitokrom b5), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler), plazma membranı (lipooksijenaz, lipid peroksidasyonu, fagositlerde NADPH oksidaz), oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon) gibi nedenler serbest radikallerinin hücre içi kaynaklarını oluşturmaktadır. Organizmada serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun ana kaynağı ksenobiyotikler ve ksenobiyotiklerin biyoaktivasyonu sonucu oluşan ürünlerdir. Birçok maddenin serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Ksenobiyotikler arasında önemli bir grubu oluşturan pestisitlerin neden olduğu toksik etkilerin ortaya çıkarılmasında serbest radikal oluşumunun önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mercan, 2004).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler (Akkuş 1995). Enzimatik antioksidantların içinde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) yer almaktadır. Enzimatik yapıda olmayan antioksidantlar arasında ise askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$  tokoferol (E vitamini), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidantları içermektedir. Organizmalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge bulunmaktadır. Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir.



Bu mekanizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında ki bu dengeye oksidatif denge adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Serafini ve Del Rio, 2004; Hermes-Lima ve Zenteno-Savin, 2002).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı oluşan savunma mekanizmaları başlıca iki grup altında toplanabilir (Winston, 1991; Hermes-Lima ve ark., 2001).

1- Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

- a- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak
- b- Oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak
- c- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak

2- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

a- Toplayıcı etki: ROT lerini etkileyerek onları tutmaya ve daha az reaktif başka moleküllere çevirmeye yönelik etki (enzimler).

b- Bastırıcı etki: ROT leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki (flavinoidler, vitaminler).

c- Onarıcı etki

d- Zincir kırıcı etki: ROT lerini ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler).

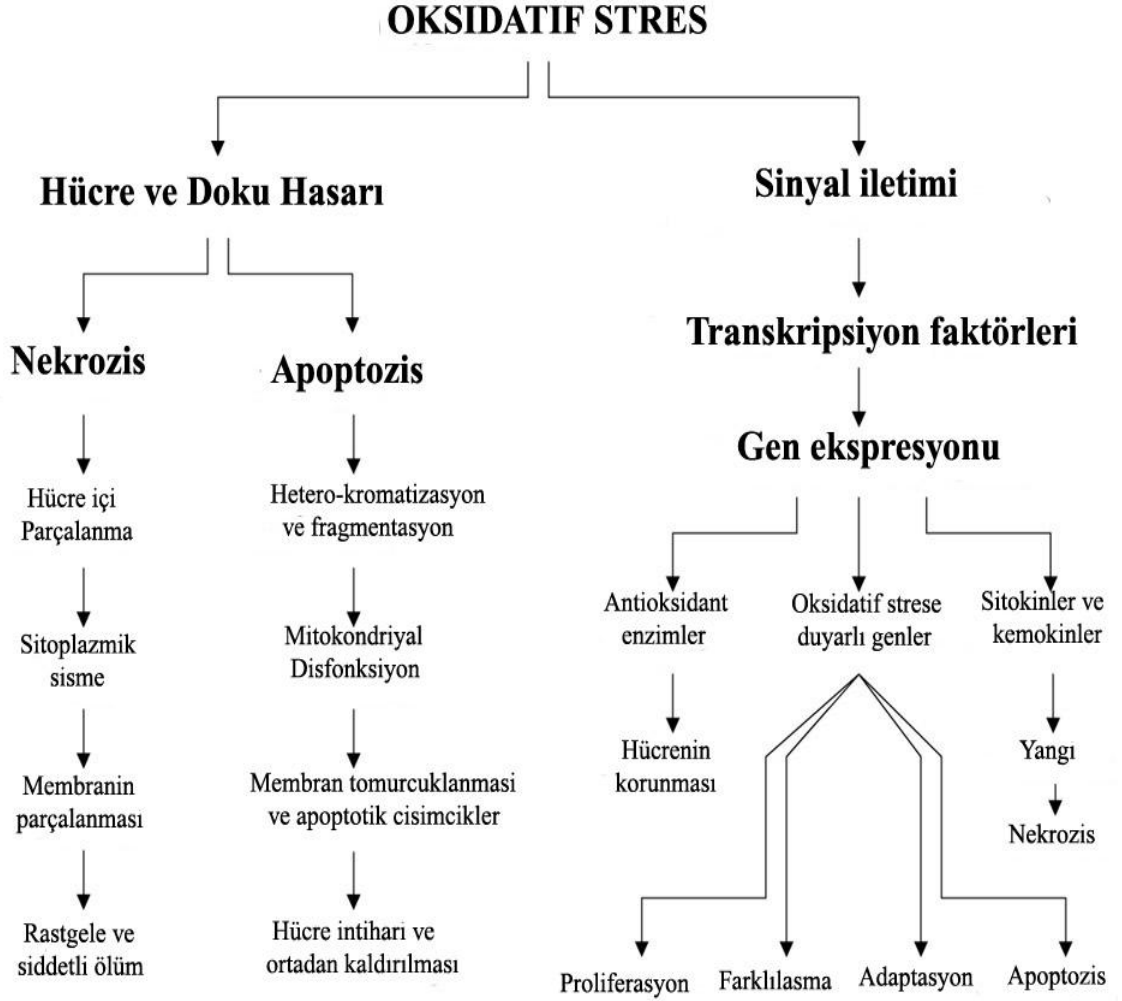
Oksidatif strese karşı ve oksidatif stres sonucunda çeşitli reaksiyonlar ve bozukluklar meydana gelebilir. Bu değişiklikler başlıca şunlardan oluşur;

1) Adaptasyon: Antioksidan savunma sistemleri kendilerini tekrar düzenleyebilirler. Örnek olarak giderek artan miktarda O<sub>2</sub> verilen ortamlarda bırakılan sıçanların antioksidan savunma enzimlerinin ve akciğerlerindeki GSH miktarındaki artış

nedeniyle düşük oksijen seviyesindeki ortamlarda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında daha dirençli oldukları gözlenmiştir. İskemi sonrası durum değişikliği ile ilgili bir başka adaptasyon örneği bulunmaktadır. İskemi sonucunda domuz kalbinde kas kontraksiyonlarının baskılandığı gözlenmiştir ve antioksidan maddelerin bu hayvanlarda koruyucu etki oluşturduğu gözlenmiştir. Buna rağmen tekrarlayan iskemiye takiben oluşan reperfüzyonda kontraktile fonksiyonların daha hızlı döndüğü, antioksidan madde sağıltımı uygulanan gruplarda ise bu koruyucu mekanizmanın ortadan kalktığı gözlenmiştir. Bu nedenle iskemi sonucu oluşan serbest oksijen radikallerinin başlangıçta tehlikeli olduğu ancak daha sonraki dönemlerde koruyucu bir özellik göstermektedir (Halliwell, 2001).

2) Doku Hasarı: Oksidatif stres DNA, protein, lipit (lipit peroksidasyon) gibi birçok moleküler yapıya zarar vermektedir. Doku hasar mekanizması tam olarak anlaşılmadığı sürece oluşan etkinin tam olarak nereden başladığı sıklıkla açık bir şekilde anlaşılamamaktadır. Esasen etkilenen dokuya göre oksidatif stresin hedef aldığı primer hücresel yapılar farklılık gösterebilmektedir. Örnek olarak birçok memeli hücresine verildiğinde belirlenebilen bir lipit peroksidasyon ya da oksidatif protein hasarı gözlenmeden önce DNA ipliklerinde artan bir kırılma gözlenmektedir. DNA ipliklerinde meydana gelen bu kopmanın nedeni hücre çekirdeğinde geçiş metal iyonları ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin reaksiyona girip OH' ya dönüşümünden kaynaklandığı gözlenmektedir (Halliwell, 2001).

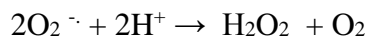
3) Hücre ölümü: Hücre ölümü genellikle nekroz ve apoptoz olmak üzere iki temel mekanizma altında meydana gelmektedir. Her iki ölüm şeklide oksidatif stres sonucunda oluşabilmektedir. Nekroz durumunda, nekrotik hücre şişip patlayarak sitoplazma içeriğini çevreye yaymakta ve çevresindeki hücreleri de etkilemektedir. Sitoplazmik içerikte katalaz veya GSH gibi antioksidan maddeler bulunabileceği gibi bakır ve demir iyonları gibi prooksidan maddelerde bulunabilir. Bu nedenle, bir hücre oksidatif stresten başka bir mekanizmayla ölmüş olsa bile nekrotik hücre ölümü sonucunda çevre hücrelerde oksidatif stres oluşabilir. Apoptoziste ise hücrenin kendi içsel ölümü söz konusu olduğu için sitoplazmik içeriğini dışarı salmaz ve apoptozis sonucunda genel olarak çevre hücrelerde bir hasar oluşmaz. Bazı nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik hücre ölümü çok hızlanabilir ve oksidatif stresin varlığı da gösterilmiştir (Halliwell, 2001).



**Şekil 2.** Oksidatif stres sonucunda organizmada gelişebilecek reaksiyonları özetleyen şema (Haddad, 2002' dan uyarlanmıştır)

#### 2.4.1.1. Süperoksit Dizmutaz (SOD)

İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dizmutazlar (SOD, EC 1.15.1.1) süperoksit radikallerinin katalitik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen ve lipid peroksidasyonu inhibe eden bir metalloenzimdir (McCord, 1988).



Bu reaksiyon kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi, SOD katalizörlüğünde 4000 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Akkuş, 1995). Normal metabolizma sırasında hücreler

tarafından yüksek oranda süperoksit radikali üretilmesine rağmen intrasellüler süperoksit miktarı SOD sayesinde düşük tutulmaktadır. Reaksiyon sonucunda membrandan geçemeyen süperoksit radikali membrandan geçebilen hidrojen peroksit'e dönüşmektedir. Hidrojen peroksit, geçiş metalleri iyonlarının varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile son derece reaktif olan hidroksil radikallerine dönüşmektedir (Rigo ve ark., 1977; Deaton ve Marlin, 2003). Bu nedenle SOD aktivitesindeki artışın oluşturabileceği aşırı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikmesinin ancak CAT ve GSH-Px enzimlerinin artan aktiviteleri ile kontrol edilebileceği ileri sürülmektedir (Kayış, 2010).

Süperoksit dismutazların çok farklı çeşitleri bulunmaktadır. Bu enzimler, aktif kısımlarında bakır, çinko, manganez, demir ve nikel kullanan proteinlerdir. Süperoksit dismutazlar, merkezlerinde bulunan geçiş metallerine göre, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Fridovich, 2001). Bunlardan Cu/Zn-SOD hem bakıra hemde çinkoya bağlanırken, Mn-SOD ve Fe-SOD ise ya demire ya da manganze bağlanan bir özellik göstermektedir.

Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) (Cu-Zn) insanlarda 21. kromozom üzerinde yer alan SOD1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir (Milani ve ark., 2011). SOD1 bakır ve çinko iyonlarına bağlanır ve diğer antioksidantlar gibi vücuttaki süperoksit radikallerinin parçalanmasından sorumludur. Mitokondri ve sitoplazmik membran arasındaki boşlukta kodlanmış olan enzim, organizmada doğal olarak oluşan ancak oldukça zararlı olan serbest radikallerin moleküler oksijene ve hidrojen peroksit'e dönüşmesine neden olmaktadır. Çalışmalarda SOD1 geninin silinmesine bağlı olarak 2 adet ailesel keratokonus vakası rapor edilmiştir (Udar ve ark., 2006). Ayrıca SOD1 geni bulunmayan farelerde yaşla ilerleyen kas kayıplarında artış (sarkopeni), erken şekillenen katarakt, makuler dejenerasyon, timusun involusyonu, hepatoselüler karsinom ve kısalan yaşam süresi gibi bulgular elde edilmiştir (Muller ve ark., 2007).

Süperoksit Dismutaz 2 (SOD2, mitokondriyal) ise, SOD2 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu gen demir/manganez süperoksit dismutaz ailesinin bir üyesidir. Bu gen homotetramer yapıda mitokondriyal matriks proteinini kodlar ve her bir alt üniteye bir manganze bağlanır. Bu protein mitokondriyal elektron transport zincirinin bir ürünü olan toksik yapıdaki süperoksitleri hidrojen peroksit'e ve diatomik oksijene dönüştürür. Bu gende meydana gelen mutasyonlar idiyopatik kardiyomyopati, sporadik motor nöron hastalığı ve kanserle ilişkilendirilmektedir (Muller ve ark., 2007).

Ekstraselüler süperoksit dizmutaz (EC-SOD) ya da SOD3 insanlarda SOD3 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Ağırlıklı olarak SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride bulunan bir enzim olmasına rağmen, ekstraselüler boşlukta süperoksit radikallerini temizleyen tek antioksidan enzim SOD3'tür. Bu nedenle ekstraselüler boşlukta meydana gelen redoks dengesinin vazgeçilmez bir unsurunu oluşturur. EC-SOD vücutta birçok doku tarafından eksprese edilse de en fazla oksijenden zengin arterlerde ve akciğerde bulunmaktadır (Zelko ve ark., 2003). Ayrıca EC-SOD serum, serebrospinal sıvı, asites ve sinoviyal sıvıların içerisinde de bulunmaktadır (Marklund ve ark., 1982).

#### **2.4.1.2. Glutasyon Peroksidazlar (GSH-Px)**

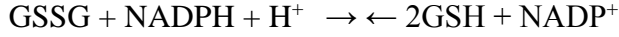
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) (EC 1.11.1.9), biyolojik rolü organizmayı oksidatif stresten korumak olan peroksidaz aktivitesine sahip olan enzim ailesinin genel bir adıdır. Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur (Deaton ve Marlin, 2003). Zar fosfolipitlerinden, fosfolipaz A2 tarafından salınan lipit hidroperoksitlere etki eder. Aktif kısımlarındaki selenosistin içeren dört farklı glutasyon peroksidaz bulunmaktadır. Ayrıca sitosolik GSH-Px'le %40'dan fazla benzer sekansa sahip diğer proteinlerde bulunur ancak bunlar selenosistin içermezler. Ayrıca GSH-Px benzeri proteinler bazı mikroorganizmalarda ve parazitik kurtlarda gözlenmektedir (Gamain ve ark., 1996).

Farklı genler tarafından kodlanan ve substrat yatkınlığı ve hücresel yerleşimi değişkenlik gösteren çeşitli izoenzimler bulunmaktadır. Glutasyon peroksidaz 1 (GSH-Px 1) en sık bulunan izoenzimdir, neredeyse bütün memeli hücrelerinde bulunur ve tercih ettiği substrat hidrojen peroksittir. GSH-Px 4 daha düşük seviyelerde memeli hücrelerinden salgılanır ve tercih ettiği substrat lipit peroksitlerdir. GSH-Px 2 ekstraselüler ve intestinal özellikte bir enzimdir. GSH-Px 3 ise ekstraselülerdir ve özellikle plazmada yoğun şekilde bulunmaktadır (Muller ve ark., 2007).

Glutasyon peroksidazın temel katalitik reaksiyonu;

$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$  şeklinde olup bu reaksiyonda GSH indirgenmiş monomerik glutasyonu simgelerken GS-SG glutasyon disulfiti temsil etmektedir. Bu mekanizma hidrojen peroksit tarafından selenosistin kalıntılarındaki

selenolün oksidayonunu içermektedir. Bu süreç sonucunda seleninik asit grupları (RSeOH ) türer. Okside glutatyon (GSSG) ise GSH-Rd enzimi yardımıyla tekrar GSH'a indirgenir (Bhabak ve Muges, 2010).



#### **2.4.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları**

Çevresel toksikantların etkilerini bir şekilde hücre ölümünü başlatarak gösterdikleri iyi bilinmektedir. Hücre ölümü biyokimyasal ve morfolojik kriterlere göre sınıflandırılabilir. Hücre ölümü için morfolojik kriterler göz önüne alındığında nekrozis, apoptozis ve otofaji olmak üzere üç farklı mekanizmadan bahsedilmektedir. Ancak karışık yapıda gözlenen birçok hücre ölüm şekli de gözlenebilmektedir. (Kromer ve ark., 2009).

##### **2.4.2.1. Nekrotik Hücre Ölümü**

Nekroz hücre membran hasarı ve hücre içi iyon dengesinin korunamamasına bağlı olarak gelişen rastlantısal ve kontrol edilemeyen hücre ölümünü tanımlamaktadır. Nekrotik hücre ölümü hücre hacminin artması, organellerin şişmesi, plazma membranının parçalanması ve takiben hücre içeriğinin kaybıyla karakterizedir. Membranda oluşan hasar şiddetli olduğu zaman lizozomal enzimler sitoplazmaya geçerek hücreyi sindirir ve nekroziste tanımlanan morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına sebep olur. Ayrıca hücre içeriği hasar görmüş olan plazma membranından ekstraselüler boşluğa geçerek konakçı reaksiyonuna (yangı) neden olur. Nekroz genel olarak iskemi, toksinlere maruz kalma, çeşitli enfeksiyonlar ve travma sonucunda oluşan hasarlara bağlı olarak şekillenmektedir (Kumar ve ark., 2014).

##### **2.4.2.2. Apoptotik Hücre Ölümü**

Eski bir Yunan terimi olan apoptoz (a-po-toe-sis), kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de J.F.K. Kerr tarafından, membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrelerin enzimatik olarak parçalandığı, hücre içeriğinin dışarıya sızdığı ve konakçı reaksiyonuna neden olan nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade etmektedir (Kerr ve ark., 1972). Apoptozis hücrenin aktif intrinsik enzimlerin aracılığı ile kendi çekirdek DNA'

sını, çekirdek ve sitoplazma proteinlerini yıkımladığı bir süreci başlatan intihar programı olarak nitelendirilen birbiriyle sıkı ilişki içinde olan birçok mekanizmanın sonucunda oluşan bir hücre ölümü şeklidir. Apoptotik süreç sonucunda sitoplazma ve çekirdek kısımlarından oluşan apoptotik cisimciklerin açığa çıktığı hücre parçalanması meydana gelir. Apoptotik hücrenin plazma membranı ve apoptotik cisimcikler bozulmadan kalır ancak yapılarında meydana gelen bazı değişiklikler nedeniyle fagositoz yapan hücreler için hedef haline gelebilmektedirler. Ölen hücreler ve hücrelere ait yapılar içeriklerini dışarı salmadan hızlı bir şekilde fagosit edilir ve bu nedenle konakçıda yangısal reaksiyona neden olamamaktadır. Genetik olarak düzenlenen bir yolak olduğu için programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanır (Kumar ve ark., 2014).

Apoptozis normal bir süreç olarak gelişim ve yetişkinlik döneminde istenmeyen, yaşlanmış ve potansiyel olarak zararlı hücrelerin uzaklaştırılmasında gözlenebildiği gibi immun reaksiyonlar gibi koruyucu mekanizmalarda veya hücrenin hastalık ya da zararlı maddelerle oluşan hasarına bağlı olarak da meydana gelebilmektedir (Norbury ve Hickson, 2001).

Fizyolojik koşullarda apoptozis, mitoz ve hücre çoğalmasıyla ters etki göstererek hücre popülasyonlarının üzerinde düzenleyici rol oynamaktadır. Erişkin bir insan vücudunda hergün yaklaşık yeni üretilen 10 milyar hücrenin düzenlenmesinde ölüm mekanizmalarının bir çeşidini uyaran apoptotik süreç rol almaktadır (Renehan ve ark., 2001). Fizyolojik durumda meydana gelen apoptozis dokularda artık ihtiyaç duyulmayan fazla hücrelerin uzaklaştırılmasında kullanılan bir fenomendir. İmplantasyon, organogenezis, gelişimsel involusyon ve metamorfoz gibi durumları içeren embriyogenezis durumunda hücrelerin yıkımlanması (Kumar ve ark., 2014), menstrüel siklus sırasında endometriyal hücreler gibi hormon uyarımlı hücrelerin involusyonu, menopozda ovaryum foliküllerinin atreziye uğraması (Tilly, 1991; Lund ve ark., 1996), kastrasyon sonrası prostat bezi atrofisi, akut yangısal yanıt sonrasında görevini tamamlamış olan nötrofillerin uzaklaştırılması (Kumar ve ark., 2014) gibi olaylar fizyolojik apoptotik ölüme verilebilecek bazı örneklerdir.

Apoptozis ayrıca konakçı tarafından reaksiyon oluşmadan hücrelerde onarımı sağlanamayan hasar durumlarında hücrelerin uzaklaştırılmalarında rol oynar. Birçok patolojik durumda apoptotik mekanizmalar aktive olabilmektedir. Radyasyon, sitotoksik

kanser ilaçları ve hipoksi gibi durumlar serbest radikal oluşumunu tetikleyerek DNA hasarına neden olabilmektedir. Eğer hücrelerdeki tamir mekanizmaları oluşan hasarı onaramazsa apoptozis uyarılır. Bu gibi durumlarda hücre DNA'sında mutasyon oluşup malign transformasyona uğramasındansa apoptozla uzaklaştırılması daha iyi bir alternatiftir. Serbest radikal oluşumu sonucunda meydana gelen hasarlarda olduğu gibi bazı proteinler kendilerini kodlayan genlerde oluşan mutasyon sonucunda uygun olmayan hatalı katlanmış protein yapılarının oluşmasına ve bu proteinlerin birikmesine neden olurlar. Endoplazmik retikulumda bu proteinlerin birikmesi sonucu endoplazmik retikulum stresi olarak tanımlanan bir durum meydana gelir ve apoptotik hücre ölümünü tetikler. Bazı enfeksiyonlarda, özellikle viral enfeksiyonlarda ya virus tarafından (adenovirus ve HIV) ya da immun yanıt sonucunda (viral hepatitis) apoptozis uyarılarak enfekte olan hücreler ortadan kaldırılmaktadır. Sitotoksik T lenfositlere özel viral proteinleri içeren virüslara karşı konakçı reaksiyonu sonucunda hastalık için rezervuar olan hücreler uzaklaştırılmış olur. Bu süreç sonucunda belirgin bir doku hasarı da meydana gelir. T hücreler aracılığı ile gelişen bu mekanizma tümör ve transplantların hücresel rejeksiyonunda oluşan hücre ölümlerinde de etkilidir. Parenkim organlarda kanal obstruksiyonu sonucunda şekillenen patolojik atrofi pankreas, parotis bezi ve böbrekte meydana gelmektedir (Kumar ve ark., 2014).

Apoptozis ayrıca yangısal hücrelerin uzaklaştırılması ve granülasyon dokusunun skar dokusuna gelişimini içeren yara iyileşmesi aşamalarında da etkin rol oynamaktadır. Yara iyileşmesi sırasında apoptotik mekanizmanın düzgün çalışmaması sonucunda taşkın granülasyon ve aşırı fibrozis gözlenebilir (Greenhalgh, 1998).

**Apoptozisteki morfolojik değişiklikler:** Apoptozis sırasında meydana gelen çok sayıdaki morfolojik değişiklik ışık ve elektron mikroskopik incelemeler sonucunda ortaya konulmuştur (Hacker, 2000). Apoptozisin erken aşamaları sırasında hücrelerin büzüşmesi ve piknotik değişiklikler ışık mikroskopuyla görülebilmektedir (Kerr ve ark., 1972). Hücrelerin büzüşmesi sonrasında, hücreler hacimsel olarak küçülürler, sitoplazma daha koyu bir görüntüye sahip olur ve organeller daha sıkı paketlenmiş halde bulunurlar. Hematoksilen ve eozinle boyanmış histolojik kesitlerin incelenmesinde apoptozisin tek hücre ya da küçük hücre kümeleri şeklinde olduğu gözlenir. Apoptotik hücreler yuvarlak ya da oval koyu renkli eozinofilik sitoplazmalı ve yoğun mor renkli çekirdek kromatini kısımlarından oluşur. Subselüler değişiklikler



elektron mikroskopik incelemelerde daha iyi tanımlanabilir. Kromatin yoğunlaşma fazının erken dönemlerinde uniform olarak dağılmış koyu çekirdekçik kısımları gözlenebilse de karakteristik olarak elektron yoğun nükleer materyal periferik olarak çekirdek zarının altında birikir. Plazma membranında meydana gelen yoğun kabarıklık karyoreksize takiben oluşur ve tomurcuklanma adı verilen süreç sonucunda hücre kısımları apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler nükleer fragmentlerin bulunduğu ya da bulunmadığı sıkıca paketlenmiş organelleri içeren sitoplazmadan oluşmuştur. Organel yapıları hala daha korunmaktadır ve tüm sitoplazmik yapılar, yapısı bozulmamış bir plazma membranı ile çevrelenmiştir. Bu cisimcikler hemen sonra makrofajlar, parenkim hücreleri veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar içinde parçalanırlar. Apoptotik hücreleri yutan ve sindiren makrofajlara "boyanabilir cisimcikli makrofajlar" denir ve sıklıkla lenfoid foliküllerin reaktif germinal merkezlerinde ve bazen de timik korteks içinde bulunabilirler. Boyanabilen cisimcikler apoptotik hücrelerden kalan çekirdek kırıntılarından oluşmaktadır. Apoptozis sürecinde apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması sırasında şu nedenlerden dolayı yangısal reaksiyon meydana gelmemektedir; 1) apoptotik hücreler hücresel yapılarını çevre intersitisyel doku içerisine salmazlar, 2) çevrelerindeki hücreler aracılığı ile hızlı şekilde fagosite edilirler ve oluşabilecek sekonder hücre ölümleri engellenmiş olur, 3) fagosite eden hücreler anti-inflamatorik sitokin üretmemektedirler (Savill ve Fadok, 2000; Kurosaka ve ark., 2003).

**Apoptozis mekanizmaları:** Apoptozis sistemin aspartat proteazlar (caspase) adı verilen enzimlerin aktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu enzimler aspartik kalıntılarından sonra proteinlerin ayrılmasına neden olan sistin proteazlardan oluşur. Birçok proteazda olduğu gibi caspase'lar inaktif proenzimler ya da zimojenler olarak bulunurlar ve aktif olabilmeleri için enzimatik ayrışmaya uğramak zorundadırlar. Aktifleşmiş caspase'ların bulunması apoptozisi gösteren önemli bir belirteçtir. Apoptotik süreç bazı caspase'ların katalitik olarak aktif olduğu başlangıç fazı ve diğer kaspazların önemli hücresel yapıların parçalanmasının başladığı ölüm fazı olmak üzere iki kısma ayrılır. Kaspazların aktivasyonu pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki dengeye bağlıdır (Kumar ve ark., 2014). Apoptozis mekanizması enerji bağımlı birçok moleküler yoldan oluşan oldukça karmaşık ve sofistike olayları içerir. Günümüzde araştırmacılar dış uyaranlar ya da ölüm reseptörü yolu ve iç uyaranlar ya da mitokondriyal yol olmak üzere iki ana apoptotik yoldan söz etmektedirler. Fakat yine

de iki yolak birbiriyle ilişkilidir ve bir yolaktaki molekül diğer yoldaki molekülü etkileyebilmektedir (Igney ve Krammer, 2002). Ayrıca T hücre aracılı sitotoksisiteyi içeren ve hücrelerin perforin-granzim aracılığı ile öldürüldüğü ek bir yolak da bulunmaktadır. Perforin-granzim yolağı apoptozisi ya granzim B ya da granzim A aracılığı ile uyarmaktadır. Bu yolak caspase 3'ün aktifleşmesi ile başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin yıkımlanması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşması, fagositik hücrelerin bağlantı reseptörlerinin oluşması ve son olarakta fagositik hücrelerin neden olduğu fagositozla sonuçlanır. Granzim A yolu ise tek iplik DNA'da hasara neden olarak kaspaz bağımsız hücre ölümünü aktive etmektedir (Martinvale ve ark., 2005).

Kaspaz aktivasyonunda iki farklı yolak tanımlanmıştır. Bu yollar birbirleriyle keşişe de genellikle farklı durumlarda uyarılırlar, farklı molekülleri içerirler ve fizyoloji ve hastalıklarda farklı roller oynamaktadırlar (Kumar ve ark., 2014).

#### **a. İç uyarılar ile (mitokondri bağlı) apoptozis mekanizması**

Mitokondriyal yol bütün memeli hücrelerindeki apoptozisin temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Apoptozise neden olan iç uyarınlı yol, doğrudan hücre içindeki hedef noktaları etkileyen ve mitokondri aracılı bir takım olayları başlatabilmektedir. Mitokondri aracılı apoptozise neden olan uyarılar pozitif ya da negatif biçimde rol oynayabilir. Negatif uyarılar içinde ölüm programının baskılanmasını durduran ve dolayısı ile apoptozisi uyarı bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkar. Radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller apoptotik süreci pozitif olarak uyarı etkenlerdir (Elmore, 2007).

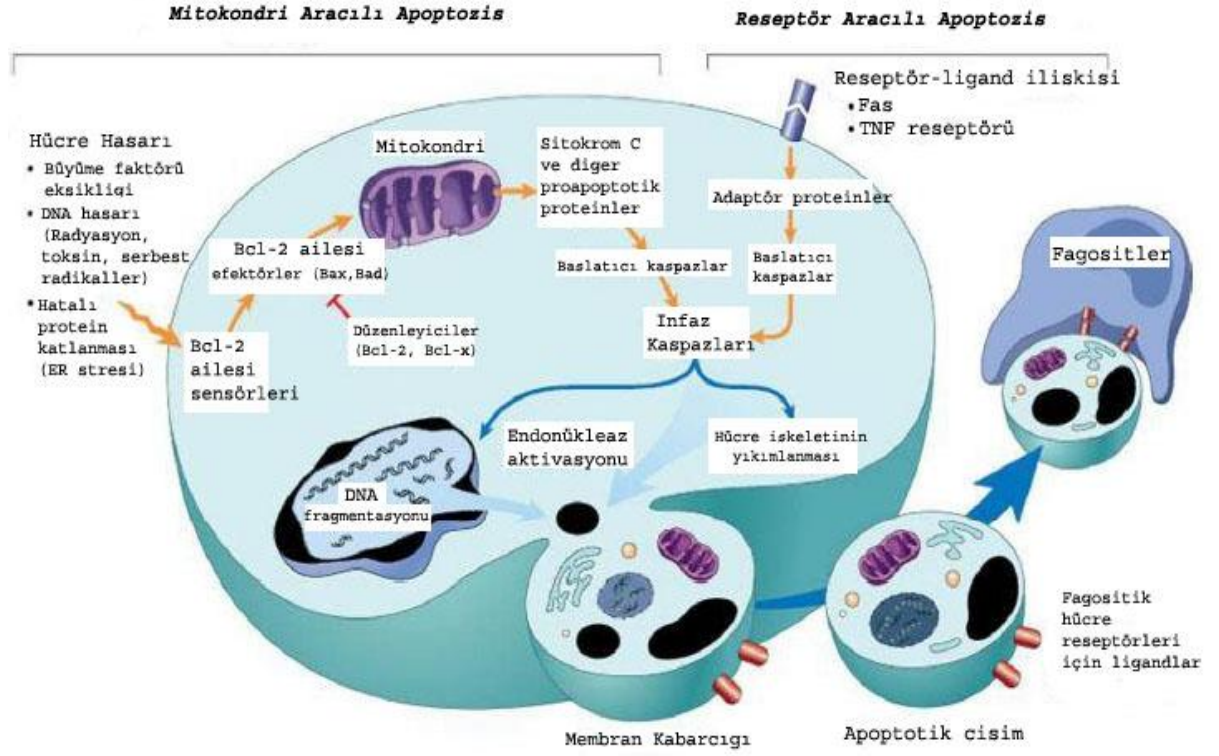
İç uyarınlı apoptozis, mitokondrinin iç membran boşluğundaki ölüm uyarıcı moleküllerin (pro-apoptotik) mitokondrinin dış membran geçirgenliğinin artması sonucu sitoplazmaya salınmasına takiben oluşur. Mitokondri yaşam için çok önemli olan sitokrom c gibi proteinleri içeren bir organeldir ancak bu proteinlerin bazılarının özellikle sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla apoptotik ölüm süreci tetiklenmiş olur. Mitokondriyal pro-apoptotik proteinlerin salınması BCL2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilir (Kumar ve ark., 2014). BCL 2 (B-hücre lenfoması) insanlarda BCL2 geni tarafından kodlanır ve uyarımla (pro-apoptotik) ya da baskılamayla (anti-

apoptotik) hücre ölümünü (apoptozis) düzenleyen proteinlerden oluşur. BCL2 spesifik olarak anti-apoptotik bir protein olarak da algılanır bu nedenle onkojenler içerisinde sınıflandırılır (Tsujimoto, 1984). Sitoplazmaya salınan sitokrom c gibi proteinler caspase bağımlı mitokondriyal yolu aktive eder. Sitokrom c, Apaf-1'e (Apoptotik proteaz aktive edici faktör) bağlanır ve bu proteini ve caspase 9'u aktive ederek apoptozom oluşumuna neden olur (Chinnaiyan, 1999). Aktive olan caspase 9 bir seri kaspaz aktivasyon serisinin başlamasına neden olarak pro caspase'ları uyarır ve apoptozisin ölüm fazının başlamasına neden olur. Smac/Diablo gibi isimlerinin kaynağı bilinmeyen diğer mitokondriyal proteinler sitoplazmaya girerek apoptozun fizyolojik inhibitörleri (IAPs, inhibitor of apoptosis proteins) olan sitoplazmik proteinlere bağlanıp nötralize ederler. Apoptozun fizyolojik inhibitörlerinin normal fonksiyonu caspase 3 gibi apoptozun ölüm aşamasında temel rol oynayan caspase'ların aktivasyonunu baskılayıp hücrenin ölmesini engellemektir. Bu nedenle apoptozun fizyolojik inhibitörlerinin nötralizasyonu caspase yolunun tetiklenmesine neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2014).

#### **b. Dış uyaranlar ile (reseptöre bağlı) apoptozis mekanizması**

Dış uyaranlı sinyal yolu transmembran reseptörlerinin etkileşimi sonrasında apoptozisi uyarmaktadır. Bu transmembran reseptörleri tümör nekrozis faktör (TNF) reseptörü geni ailesine ait olan ölüm reseptörleridir (Locksley ve ark., 2001). TNF reseptör ailesi ekstraselüler kısımda bulunan sistinden zengin bir yapıya ve 80 aminoasitten oluşan ve "death domain" adı verilen sitoplazmik kısma sahiptir (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Bu yapılar ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içindeki sinyal yoluna iletilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. En iyi bilenen ölüm reseptörü tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve bununla ilişkili Fas (CD95) proteindir. Apoptozisi uyaran Fas ile ilişkilendirilen ölüm reseptörleri birçok hücre tarafından eksprese edilmektedir. Fas için bulunan liganda Fas ligand (FasL) denir. FasL self antijenleri tanıyan T hücrelerden ve bazı sitotoksik T lenfositlerden eksprese edilirler. FasL Fas'a bağlandığı zaman üç veya daha fazla Fas molekülü bir araya gelir ve bunların sitoplazmik ölüm bölgeleri FADD (Fas ile ilişkili ölüm domaini) adı verilen ve üzerinde de kendi ölüm bölgeleri bulunan adaptör proteinler için bağlanma noktası oluştururlar. Ölüm reseptörüne bağlanan FADD death domainleri aracılığı ile aktif olmayan caspase 8'e bağlanır. Çok sayıdaki pro-caspase 8 molekülü birbirine yaklaşır ve aktif caspase

8'leri şekillendirirler (Hsu ve ark., 1995; Wajant, 2002). Gelişen bu zincirleme reaksiyonlar mitokondriyal yolda da benzer şekilde meydana gelir ve çok sayıda ölüm fazı kaspazlarının aktivasyonu ile sonuçlanır (şekil 3).



Şekil 3. İç ve dış uyaranlar ile apoptozis mekanizması (Kumar ve ark., 2014'dan uyarlanmıştır)

**Endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen apoptozis:** Endoplazmik retikulum birçok hücre fonksiyonu yerine getiren bir organeldir. Endoplazmik retikulumun lumeni  $Ca^{+2}$  ATPazlar vasıtasıyla kalsiyum iyonlarını aktif şekilde taşıdığı için hücre içindeki kalsiyumun en yoğun bulunduğu bölgedir. ER lumeni oksidatif bir ortamdır ve disulfid bağlarının oluşmasında kritik rol oynadığı gibi hücre yüzeyinde görev yapan ya da salgılanan proteinlerin uygun şekilde katlanmasından sorumludur. Protein katlanması ve taşınmasındaki rolü nedeniyle protein katlanmasında aracılık yapan  $Ca^{+2}$ 'la ilişkili Grp78, Grp 94 ve kalretikulin gibi moleküler şaperonlardan zengindir (Chunyan ve ark., 2005). ER' da bulunan bu şaperonlar yeni sentezlenmiş proteinlerin uygun katlanmasında ve hatalı katlanan polipeptidlerin ubiquitinleşmesinde ve proteozomlarda proteolizise uğramasında görev yapmaktadırlar. Eğer bir şekilde katlanmamış ya da hatalı katlanmış proteinler katılımsal mutasyonlar ya da stres gibi

nedenlerle ER' da birikirlerse "hatalı katlanmış protein yanıtı" adı verilen bir dizi hücrel reaksiyonun oluşmasına neden olur. Hatalı katlanmış protein yanıtı sonucunda şaperon üretimin artar ve böylelikle anormal proteinlerin proteozomal parçalanması gerçekleşir ve protein translasyonu yavaşlatılarak hücrede hatalı katlanmış protein birikiminin önüne geçilir. Eğer hücre bu koruyucu mekanizmalar aracılığı ile hatalı katlanmış protein birikimini önleyemez ise hücre caspase'ları aktive ederek apoptotik süreci başlatır (Kumar ve ark., 2014).

**Apoptoziste ölüm fazı (Executioner Pathway):** Dış uyarımlı ve iç uyarımlı yolların ikisinde son aşaması ve apoptozisin son yolağı ölüm fazıdır. Apoptozisin bu aşamasını başlatan, ölüm caspase'larının aktivasyonudur. Ölüm caspase'ları nükleer materyali parçalayan endonükleazlarla çekirdek ve hücre iskelet proteinlerini parçalayan proteazları aktive etmektedir. Caspase 3, caspase 6 ve caspase 7 apoptotik hücrede sitokeratin, plazma membranı hücre iskelet proteini alfa fodrin, NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) çekirdek proteini gibi substratları parçalayarak morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olan efektör yada ölüm caspase'larıdır (Slee ve ark., 2001). Caspase 3 infaz kaspazları içinde en önemli olanıdır ve başlatıcı kaspazlar (caspase 8, caspase 9 ve caspase 10) tarafından aktive edilir. Caspase 3 özel olarak endonükleaz CAD' ın (caspase aktiviteli DNAaz) aktivasyonundan sorumludur. Bölünebilen hücrelerde CAD' lar baskılayıcı proteinleri olan ICAD' larla (inhibitor of CAD) birlikte bulunurlar. Apoptotik hücrelerde aktive olmuş olan caspase 3 ICAD' ı parçalayarak CAD salınımına neden olur (Sahira ve ark., 1998). CAD daha sonra çekirdekteki kromozomal DNA'yı parçalayarak kromatinin birikimine neden olur. Ayrıca Caspase 3 hücre iskelet yapısının tekrar yapılmasına ve hücrenin apoptotik cisimciklere parçalanmasında rol oynamaktadır (Elmore, 2007).

#### 2.4.2.3 Otofajik Hücre Ölümü

Otofaji hücrenin kendi yapısal unsurlarını sindirdiği bir reaksiyondur. Ökaryotik hücrelerin hayatta kalabilmek için makromolekülleri ve organelleri indirgediği ve geri dönüşümlerini sağladığı temel katabolik yoldur. Otofaji çeşitli basamakları içeren bir süreçtir. İlk olarak fagofor adı verilen endoplazmik retikulumdan köken aldığı düşünülen bir izolasyon membranı oluşur. Birbiriyle sıkı ilişkili çift membran yapısından oluşan bu yapıya otofagozom denir. Otofagozomun maturasyonu sonucu lizozomla birleşir ve asidik lizozomal hidrolazlar aracılığı ile hücrel unsurlar

indirgenir (Kumar ve ark., 2014). Eğer otofaji uzun sũrede geręekleřirse hũcre ۆlũmũne neden olabilir. Otofajik hũcre ۆlũmũ morfolojik olarak kromatin kũmelenmesi olmadan sitoplazmada oluşan bũyũk otofajik vakuollerin varlığı ile tespit edilir (Kroemer ve ark., 2009).

Otofaji strese karşı hũcre sel reaksiyonda rol aldığı gibi farklılaşma ve gelişim aşamasında çok ۆnemli fonksiyonları bulunmaktadır (Kroemer ve ark., 2009). Hũcre için gerekli metabolitlerin dۆngũsũnũ sağlayarak ve hũcre sel kalıntıları temizleyerek hũcre yapısının korunmasında etkin rol oynamaktadır. Bu nedenle besin yetersizliğine bağlı gelişen şiddetli atrofik hũcrelerde yoğun şekilde açığa çıkmaktadır. Endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozom gibi çeşitli organellerin dۆngũsũnde de fonksiyon gۆsteren otofaji yaşlanma, stres ve diğer hastalık durumlarında biriken intraselũler maddelerin temizlenmesine neden olur (Kumar ve ark., 2014).

### **2.4.3 Oksidatif Stres ve Apoptozis**

Oksidatif stres farklı apoptotik enzimlerin aktivasyonu ile ilişkili olmasına rağmen altında yatan mekanizma halen daha tam olarak anlaşılamamıştır. Oksidatif stresin neden olduğu apoptozis bũyũk ۆlũde mitokondriyal seviyede i uyaranlı apoptotik mekanizma sonucunda oluşmaktadır. Elektron transport zinciri ile olan yakınlığı ve koruyucu histon yapılarının bulunmaması nedeniyle reaktif oksijen tũrlerinin ۆnemli hedef noktalarından birisi mitokondriyal DNA'dır (mtDNA). ROT' ların neden olduğu oksidatif mtDNA hasarı elektron transportu, mitokondriyal membran potansiyeli ve ATP ۆretimini bozarak respiratorik disfonksiyonu tetikler ve ۆlũmcũl hũcre hasarına neden olur. Ayrıca mitokondrideki reaktif oksijen tũrleri mitokondriyal akonitaz ve kompleks I Nikotinamid Adenin Dinũkleotit (NADH) gibi proteinleri okside edip inaktif hale getirdiği için daha sonra oluşacak oksijen radikallerinin birikimini de arttırmaktadır. Mitokondri seviyesinde geręekleřen lipid peroksidasyonu da ayrıca mitokondri metabolizmasını bozmakta ve mitokondriyal geçirgenlik porlarını (MPTP, mitochondrial permeability transition pores) uyarmaktadır (Ott ve ark., 2007). Ayrıca glutatyonun (GSH) tũkenmesine neden olan oksidatif reaksiyonlar tiyol oksidasyonu sonucunda mitokondriyal geçirgenlik porların açılmasına neden olur (Marchetti ve ark., 1997). Solunum zincirindeki benzersiz etkisi nedeniyle mitokondriyal geçirgenlik porları indirgenmiş NADH<sub>2</sub>/NADPH<sub>2</sub> (nikotinamid adenin dinũkleotit fosfat) seviyesinin azalmasına ve glutatyon peroksidaz reaksiyonu

sonucunda mitokondriyal ve sitosolik GSH'in oksidasyonuna neden olmaktadır (Hoek ve Rydström, 1988). Mitokondriyal geçirgenlik porları solunum zincirindeki olaylar sonucunda aşırı süperoksit anyonu üretimini tetikleyerek GSH seviyesinde azalmaya neden olur. Bu GSH seviyesindeki azalma mitokondriyal geçirgenlik porlarının fonksiyonunu baskılayan BCL2 tarafından engellenebilir bu nedenle BCL2 antioksidant olarak görev yapmaktadır (Hockenberry ve ark., 1993). Son olarak da apoptotik süreç sonucunda aniyonik fosfolipid kardiyoipinin oksidasyonuna bağlı olarak sitokrom C'nin iç mitokondriyal membrana bağlanması sonucunda kardiyoipin sitosole salınır (Ott ve ark., 2007). Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri direkt olarak c-jun N-terminal kinase (JNK), tümör nekrozis faktör ilişkili sinyal düzenleyici kinaz 1 kompleksi ve kaspaz yolağı gibi çeşitli sinyal yollarını tetikleyerek endoplazmik retikulumu stres altına alıp apoptozise neden olur. Endoplazmik retikulumda Redoks mekanizmasındaki dengesizlik sonucu oluşan stres apoptozisin en yaygın gözlenen nedenidir ve hatalı katlanmış ya da katlanmamış protein yapılarının endoplazmik retikulumda birikimine neden olur. Glutasyon, askorbat, flavin adenin dinükleotit (FAD), tokoferol, ve vitamin K gibi antioksidant koruma sistemleri endoplazmik retikulumda bulunur. Sipermetrin gibi piretiroidlerin oksidatif strese, DNA hasarına ve mitokondriyal apoptotik mekanizmayı tetiklediği bildirilmiştir (Calviello ve ark., 2006; Jin ve ark., 2011).

## 2.5. Primer Karaciğer Hücre Kültürü

Canlı organizmalar binlerce genin, protein moleküllerinin, RNA molekülünün, küçük organik bileşiklerin, inorganik iyonların ve çevredeki diğer yapılarla ilişkilerini uyumlu bir şekilde yöneten fonksiyonel bir yapıya sahiptir (Albert, 2008). Organizmanın hayatta kalabilmesi için tüm bu unsurların uyumlu bir şekilde çalışıp, organizmanın beslenmesi, atıkların uzaklaştırılması, yapısındaki unsurları uygun konumlarda bulundurması gerekmektedir. Ayrıca diğer uyarıcı moleküllere, organizmalara, ışık, ses, ısı, tat, dokunma, denge gibi dış uyaranlara yanıt vermesi gerekmektedir. Bu nedenle *in vivo* çalışmalarda tüm bu koşulların deney şartları üzerinde etkisi olduğu görülmektedir. Hücre kültürlerinin tasarlanma amacı deney şartlarının olabildiğince bu dış şartlardan arındırılıp doğrudan istenilen çalışma sonrasında görülecek etkilerin incelenmesi amacıyla geliştirilmiştir (Wilkening ve ark., 2003; Edwards ve ark., 2013).

Karaciğer kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda temel rol oynayan organdır. Ayrıca sindirim sistemi ve sistemik dolaşım ile sıkı bir ilişki içinde olması nedeniyle dışarıdan sindirim yoluyla ya da ilaçlarda olduğu gibi enjeksiyon sonucu vücuda giren kimyasallara çok sık maruz kalmaktadır. Karaciğerin temel fonksiyonu aminoasit, lipid, karbonhidrat ve vitaminleri almak, bunların fazlalarını depolamak, metabolik dönüşümü sağlamak ve bu maddeleri kan ve safra içine salmaktır. Ayrıca dışarıdan alınan yabancı maddelerin biyotransformasyonunda temel rol üstlenmektedir (Sendensky ve Dufour, 2011). Bununla birlikte binden fazla ksenobiyotik maddenin potansiyel hepatotoksik özellikte olduğu bilinmektedir. *In vivo* şartlarda karaciğerde oluşan hasar potansiyel toksik maddelerin vücuda alınması, biyotransformasyonu ve uzaklaştırılması sırasında birbiriyle etkileşim halinde olan çok sayıda karmaşık hücresel reaksiyonun sonucunda oluşmaktadır. Karaciğer toksinleri temel hücresel yapılarla (protein, lipid, RNA, DNA vb) reaksiyona girebilir ve karaciğerde en sık hepatosteatozis olmak üzere her türlü lezyonun oluşmasına neden olabilirler. Hasardan sorumlu olan etken ne olursa olsun, karaciğerde oluşan etkiye dokusal, hücresel ve moleküler düzeyde tespit edilen değişikliklerle reaksiyon verir (Gupta, 2007). Buna rağmen *in vivo* şartlarda bir maddenin primer etkisi ile sekonder etkilerinin birbirinden ayrılması oldukça güçtür çünkü karaciğerin fonksiyonları endojen ve eksojen birçok faktörden etkilenmektedir ve birçok organla da karmaşık bir işbirliği içindedir. Bununla birlikte karaciğer fonksiyonları üzerine yapılan birçok çalışma hayvan modelleri üzerinde yapılmaktadır ve elde edilen bilgiler insanlarda yapılan çalışma sonuçlarından farklı sonuçlar vermektedir. İlaçlar ya da kimyasallarla oluşan hepatotoksisite çalışmalarının dezavantajları nedeniyle potansiyel hepatotoksik bileşiklerin görüntülenmesinde ve karaciğer lezyonlarına neden olan mekanizmaların anlaşılmasında *in vitro* karaciğer sistemleri daha iyi deneysel bir yaklaşım sağlamaktadır. İzole edilmiş karaciğer preparatlarının en yaygın kullanılanları izole ve perfüze edilmiş organ ya da doku kesitleri, subselüler fraksiyonlar, izole edilmiş ve kültürlenmiş hepatositlerdir. Toksisite çalışmalarında izole edilmiş ve kültürlenmiş hepatositler en çok kullanılan modellerdir (Guillouzo, 1998).

Hücre kültürleri ilk olarak yirminci yüzyılın başında hayvan hücrelerinin normal homeostatik veya stres koşullarındayken yapılan *in vivo* şartların oluşmadığı ortamlarda çalışılması amacıyla tasarlanmıştır. Primer karaciğer hücre kültürü çeşitli karaciğer fiziolojisi ve patofiziolojisi üzerindeki araştırmalarda *in vitro* model olarak



kullanılmaktadır (Gebhardt, 1996). Bu tarz hücre kültürleri özellikle sitokrom P450 gibi ilaç metabolize eden enzimlerin ekspresyonları ve fonksiyonlarının ölçülmesinde, ilaç metabolizmasının, ilaç-ilaç etkileşimleri belirlenmesinde ve sitotoksikite ve genotoksikite mekanizmalarının anlaşılmasında kullanılmaktadır. Son yıllarda primer karaciğer hücre kültürleri üzerindeki çalışmalar karaciğere özel genlerin düzenlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Primer kültürler bu genlerin düzenlenmesinde çevrenin rolünü ortaya koymaya ve hücre fonksiyonları üzerinde özelleşmiş rollerinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Boess ve ark., 2003).

Hepatositler tüm karaciğer dokusundan ya da karaciğerin bir kısmından elde edilebilmektedir. Günümüzde insan hepatositleri genel olarak primer veya sekonder tümörlü ya da diğer karaciğer hastalıklarının görüldüğü karaciğer dokusundan ve daha az oranda transplantasyona uygun olmayan karaciğerden rezeke edilmektedir. İn vivo hepatositlerle karşılaştırıldığında izole edilmiş olan hepatositler yapısal özelliklerini ve fonksiyonlarını büyük oranda korurlar ancak hücreler arası bağlantılar gibi özel hücre membranı yapılarını ve safra kanal yapılarını kaybederler ve süspansiyonlarda birkaç saatten fazla canlı kalamazlar. Daha uzun süre yaşayabilmeleri için tutunacak bir zemine ihtiyaç duymaktadırlar. Geleneksel hücre kültürü ortamlarına ekildiklerinde tekrar kümelenir ve safra kanalı yapıları gibi oluşumları yeniden şekillendirebilirler ancak erken fenotipik değişiklikleri açığa çıkarırlar ve sadece birkaç gün boyunca canlı kalabilirler (Waring ve ark., 2003).

Karaciğer sitotoksik özelliği olmayan kollajenaz gibi proteolitik enzimlerle damarlar ya da kapillarlar aracılığı ile uygun bir akış hızında perfüze edilip ve karaciğer önceden kandan arındırılıp kalsiyum içermeyen solüsyonlarla  $Ca^{2+}$  uzaklaştırılırsa hepatositlerin arasındaki bağ doku ağı 15 dk içinde parçalanabilir. Elde edilen karaciğer hücreleri süspansiyon içinden iki ya da üç farklı sayıda santrifüj yapılarak ayrılırlar. Primer hepatositler *in vitro* şartlarda çoğalmazlar bu nedenle her çalışmada taze olarak izole edilmelidirler. İzolasyon için en çok kullanılan hayvan sıçandır ve % 90 üzerinde canlılığını koruyan ve 100 ile 400 milyon hepatosit rutin şekilde elde edilebilmektedir (Freshney, 2005).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Hepatosit İzolasyonu İçin Kullanılan Sıçanlar

Çalışmada kullanılan hepatositlerin elde edilmesi için Spraque Dawley ırkı (yaklaşık ağırlığı 300 gr) erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan gereken izinler alındı (HAYDEK/49). Tez materyali olarak kullanılan hepatosit kültürü, Berry ve ark., 1969 tarafından geliştirilen ve oldukça saf ve yüksek yaşama gücüne sahip hepatositlerin izole edilebildiği iki basamaklı enzimatik ayırma metodu yoluyla elde edildi (Freshney, 2005).

#### 3.2. Primer Karaciğer Hücre Kültürünün Elde Edilmesi ve Toksikasyon

**Tablo 1.** Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve karşılayıcı firmalar

<b>Kimyasal Maddeler</b>	<b>Firmalar</b>
L-15 Levibovitz Medyum	Sigma-Aldrich, USA
F-12 Ham Medyum	Sigma-Aldrich, USA
Sığır İnsulini	Sigma-Aldrich, USA
Minimal Esansiyel Medyum	Sigma-Aldrich, USA
Medyum 199	Sigma-Aldrich, USA
Sodyum Piruvat	Sigma-Aldrich, USA
Penisilin-Streptomisin Kombinasyonu	Sigma-Aldrich, USA
Fötal Sığır Serumumu	Sigma-Aldrich, USA
Hidrokortizon Hemisüksinat Sodyum Tuzu	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Kollajenaz	Sigma-Aldrich, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, USA
Deltametrin Analitik Standartı	Sigma-Aldrich, USA

### 3.2.1. Kullanılan Medyumlar ve Ekipmanlar:

- 1) L-15 Levibovitz medyumu.
- 2) %0.2 bovine albumin ve 10µg/ml bovine insulin ile zenginleştirilmiş Hams F12 medyumu.
- 3) Hepatosit minimal medyumu (HMM): % 67.5 Eagles minimal esansiyel medyumu, % 22.5 medyum 199, 5 µg/ml sığır insulini, 1 mg/ml sığır serum albumini (BSA), 20 mM piruvat, 100 U/ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin, % 20 fetal sığır serumu (FBS).
- 4) Serum içermeyen (SF) hepatosit minimal medyumu (HMM):  $1 \times 10^{-5}$  M hidrokortizon hemisüksinat içeren serum içermeyen HMM.
- 5) pH'ı 7.65 olan kalsiyum içermeyen HEPES ((4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ) solüsyonu: 160.8 mM NaCl, 3.15 mM KCl, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 33 mM HEPES
- 6) Kollajenaz solüsyonu: % 0.025 kollajenaz, % 0.075  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 7) Ketamine 100 mg/mL, Ksilazin 20 mg/mL
- 8) Ekipmanlar: Bisturi, küt uçlu ince forseps, makas, hemostat, pamuk ve 2-3 adet steril  $2 \times 2$  boyutunda tampon.
- 9) 60-80 µm çapında porlara sahip naylon filtre.
- 10) Peristaltik pompası, % 70'lik etanol, 3.0 iplik, 20 G katater, 10 cm'lik petri kabı, 50 ml'lik konik tüpler.

### 3.2.2. Hepatosit İzolasyonu İçin Uygulanan Protokol:

- 1) HEPES solüsyonu ve kollajenaz solüsyonu yaklaşık 38-39 °C sıcaklığa sahip su banyosu içerisine bırakıldı.
- 2) Peristaltik pompası dakikada yaklaşık 30 ml sıvı pompalayacak şekilde ayarlandı.
- 3) Ortalama 140-180 gr ağırlığa sahip olan sıçan ketamin (50-80 mg/kg) ve ksilazinin (5-10mg/kg) sırayla periton içine verilmesiyle genel anestezi altına alınmıştır.
- 4) Sıçanın anestezi altına girmesiyle birlikte dorsal pozisyonda tespit edildi. Pubisten ksifoid çıkıntısına kadar olan abdominal bölge tıraş edilip %70'lik etil alkolle temizlendi.
- 5) Abdominal deride mediyan bir ensizyon yapıp, ensizyon hattı linea alba boyunca karın boşluğunun içerisine doğru genişletildi.

6) Son vertebralar hizası boyunca ksifoide yapılan ensizyon omurgaya doğru genişletildi. Karın boşluğunun orta kısmından yine aynı şekilde lateral yönlü iki ensizyon yapılarak karın duvarı hemostatlar aracılığı ile iki tarafa doğru açıldı.

7) Bağırsaklar karın boşluğundan çekilerek sıçanın soluna yatırıldı. Portal vena, pankreas ve safra kanalları, abdominal aorta ve inferior vena kavanın pozisyonları tespit edildi.

8) Karaciğerin ventral ve anterior kısmındaki falsiform ligamentler ayrıldı.

9) Karaciğerden yaklaşık 5 mm uzaklığa portal vena üzerine sıkı bir ligatür atılıp kateter karaciğere doğru portal vena içerisinden yönlendirildi.

10) Fazla basınç nedeniyle oluşabilecek istenmeyen durumların engellenmesi için hızlıca subhepatik damarlar kesildi ve 500 ml kalsiyum içermeyen HEPES solüsyonu 30 ml/dk hızla verilerek perfüzyon işlemine başlandı. Karaciğer saniyeler içinde beyazlaşmaya başlaması perfüzyonun başarılı olduğu gösterdi.

11) 20 dakika boyunca 300 ml kollajenaz solüsyonu 15 ml/dk hızla perfüze edilerek enzimatik ayırma işlemi başlatıldı. Bu işlem sonucunda karaciğerin şiştiği gözlemlendi.

12) Karaciğer karın boşluğundan çıkarılarak HEPES solüsyonu içerisinde yıkandı.

13) Karaciğerin glison kapsülü parçalanarak hücreler L-15 Levibovitz medyumu içerisine dağıtıldı.

14) İki katlı 60-80 µm por genişliğine sahip naylon filtrelerde süspansiyon süzülerek oda ısısında yaklaşık 20 dk. canlı hücrelerin çökmesi için beklenildi ve yaklaşık 60 ml'lik ölü hücre ve doku kalıntılarını içeren süpernatant uzaklaştırıldı.

15) 3 kez 50 g hızında 40 sn yavaş santrifüj yapılarak kollajenaz solüsyonu, hasarlı hücreler ve parenkimal olmayan hücreler uzaklaştırıldı.

16) Süspansiyondaki izole edilmiş olan hepatositler HMM (hepatosit minimal medium) içerisine katıldı.

17) 2- 3 saat sonra yaşayan hücreler plastiğe yapışmaya ve dağılmaya başladı ve süpernatant medyum ile birlikte ölü hücreler uzaklaştırıldı.

18) Hücre veriminin ve hücrelerin canlılıkları Trypan Blue solüsyonu kullanılarak tespit edildi.

19) Yeterli hücre yoğunluğu ve yaşama gücüne sahip hücrelerin elde edildiği kanaatine varılınca hücreler yüzeye tek tek düşecek şekilde sıklıkları besi yerleri ile

sulandırılmaları yapılarak grup sayılarına ve yapılacak çalışmalara uygun sayıda sıçan kuyruk kollajeni ile kaplanmış flask ve platelere ekimleri yapıldı.

### 3.2.3. Sıçan Kuyruk Kollajeni ile Flask ve Plate Yüzeylerinin Kaplanması:

Hepatositlerin flask ve plate yüzeylerine tutunmalarını sağlayabilmek için flask ve plateelerin ekim yapılacak yüzeyleri tip 1 sıçan kuyruk kollajeni (Roche, Cat No. 11 179 179 001) ile kaplanmıştır. Hücre kültürü ekimi için kullanılacak yüzeylerin kollajen ile kaplanmasında kullanılan method şu şekildedir:

- 1) Liyofilize kollajen içeren viyaller % 0.2'lik 5 ml asetik asitle çözdürülerek son konsantrasyon 2 mg/ml olacak şekilde ayarlandı.
- 2) Kaplanacak her cm<sup>2</sup> alan için 2,5 µl bu solüsyondan kullanıldı.
- 3) Steril bir lastik kazıyıcı aracılığı ile solüsyon flaskların ve plateelerin yüzeylerine dikkatlice dağıtıldı.
- 4) Laminar kabin içerisinde 60 dk boyunca yaklaşık 20 °C sıcaklıkta havada kuruması sağlandı.
- 5) Kaplanan flask ve plateer steril ortamda ekim yapılncaya kadar saklandı.

### 3.2.4. Çalışma Grupları ve Toksikasyon

Flask ve plate yüzeyine hepatositler ekildikten sonra 24 saatlik ön inkubasyonda tutulan hücrelere deltametrinin çalışma dozları DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözülerek verilmeye başlandı. Çalışma grupları üç farklı zamanda (24, 48 ve 72) ve üç farklı dozda (1 µM, 10 µM, 100 µM) olacak şekilde deltametrine maruz bırakılarak tablo 2'de belirtilen gruplar oluşturuldu.

**Tablo 2.** Çalışma gruplarında yapılan dozlamalar ve maruziyet süreleri

<b>Gruplar (Deltametrinin Dozu)</b>	<b>Deltametrine maruz kalınan saatler</b>
1 µM (mikromolar)	24, 48, 72 saat inkübasyon süresi
10 µM (mikromolar)	24, 48, 72 saat inkübasyon süresi
100 µM (mikromolar)	24, 48, 72 saat inkübasyon süresi
DMSO (dimetilsülfoksit)	24, 48, 72 saat inkübasyon süresi
HMM (hepatosit minimal medyum)	24, 48, 72 saat inkübasyon süresi

İstenilen dozda ve planlanan sürelerde deltametrine maruz bırakılan hepatositlerden 6 gözlü platelere ekim yapılanlar immunositokimyasal inceleme için kullanılması amacıyla ethanolde fikse edilirken, flasklara ekim yapılan ve aynı işlemler uygulanan hepatositler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonuyla (GZ-PZR, gerçek zamanlı PZR) oksidatif strese rol oynayan GPx, Sod 1 ve Sod 2' nin ekspresyonlarının incelenebilmesi için mRNA (messenger RNA) izolasyonu yapmak amacıyla kullanıldı.

Deltametrinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerindeki apoptotik etkileri caspase 3, caspase 8, caspase 9 ve TUNEL immun-reaksiyon sonucu pozitif boyanan hücre sayılarının toplam hücre sayılarıyla yüzdeler olarak oranlanması ile elde edildi. Söz konusu piretiroid insektisidin primer karaciğer hücre kültürü üzerindeki oksidatif etkileri ise SOD 1, SOD 2, Gpx 1 proteinlerinin ekspresyonlarının immunositokimyasal ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) sonucunda değerlendirilmesine bağlı olarak ortaya konuldu.

### 3.3. İmmunositokimyasal İnceleme

**Tablo 3.** İmmunositokimyasal incelemede kullanılan antikorlar

Antikor (Klon)	Antikor Türü	Antikor Konağı	Kullanılan Dilusyon	İnkübasyon Süresi	Üretici Firma	Katalog Numarası
Cu-Zn SOD	Poliklonal	Tavşan	1/50	21 °C'de 1 saat	Novus Biological	LB100-1973
SOD 2	Poliklonal	Tavşan	1/100	21 °C'de 1 saat	Abcam	Ab13533
GPx-1	Monoklonal	Fare	1/50	21 °C'de 1 saat	LifeSpan Biosciences	LS-C192311
Aktif Caspase 3	Poliklonal	Tavşan	1/200	21 °C'de 1 saat	Cell Signaling	9661
Aktif Caspase 8	Poliklonal	Tavşan	1/50	21 °C'de 1 saat	Novus Biological	NB100-56116
Aktif Caspase 9	Poliklonal	Tavşan	1/50	21 °C'de 1 saat	LifeSpan Biosciences	LS-C12574

#### 3.3.1. İmmunositokimyasal Tekniğin Uygulanması

6 gözlü platelere ekimleri yapılan ve çalışma planı doğrultusunda uygun doz ve zamanda deltametrine maruz bırakılan hepatositler inkübasyon süreleri dolduktan sonra 3 kez phosphate buffered saline (PBS, pH 7,4) ile yıkandıktan sonra %100'lük alkolle tespit edildi. Tablo 3'de belirtilen proteinlerin varlığının değerlendirilebilmesi için

StreptAvidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği (SABK) uygulandı. SABK teknik için alınan hazır kit (Invitrogen, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Primer antikorlar çalışıp çalışmadığı üretici firmalarının önerdiği pozitif kontrollerle belirlenip hepatositlerin sürekli içinde bulunduğu yaşamları ve fonksiyon göstermeleri için gerekli maddeleri içeren HMM (hepatosit minimal medyum) negatif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca deltametrimin dozlandırılmasında kullanılan ve içerisinde deltametrin bulunmayan DMSO başka bir grup olarak değerlendirildi. Kültüre edilmiş hepatositlerdeki özgül olmayan antijen-antikor reaksiyonlarını engellemek için protein bloklama solusyonunda 10 dk tutulan hücreler daha sonra primer antikorlarla tablo 3 'de belirtilen sulandırma oranlarında, sıcaklıkta ve saatte inkübe edildi. Platelerinin yüzeyi biotinle işaretli sekonder antikorla 30 dakika muamele edildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumda inkübasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra hücre yüzeyleri 3 kez 5dk boyunca PBS ile yıkandı. Son olarakta hücreler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Invitrogen, AEC red substrat kit, California, USA) ile kontrollü olarak maksimum 3 dk boyunca boyandı. Lillie-Mayer Hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıp su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile hücrelerin yüzeyi kapatılıp inceleme işlemleri Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve Nikon DS Camera Head DS-5M ile mikroskobik fotoğrafları çekildi.

### **3.3.2. Hepatositlerdeki Apoptozisin Belirlenmesi**

Hepatositlerdeki apoptozisin varlığı TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla hazır ticari kit kullanılmıştır (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, POD, katalog no: 11684817910). Teknik apoptotik süreç sırasında meydana gelen DNA fragmentasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır. Apoptozis sırasında oluşan 200 baz çiftlik DNA kırıklarında oluşan serbest 3'OH uçlarına floresans ile işaretli oligonükleotidlerin terminal nükleotidil enzimi ile eklenmesi temeline dayanmaktadır. Kültüre edilmiş hepatositler belirlenen dozlar ve zamanlar doğrultusunda deltametrine maruz bırakıldıktan sonra alkol ile tespit edildi. Hücreler TdT (terminal deoxynucleotidyl transferaz) enzimi ile işaretleme solüsyonu karışımında 37 °C' de 1 saat tutulduktan sonra özgül olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için protein

bloklama solusyonunda 10 dakika tutuldu. Peroksidaz ile konjuge anti-flouresein izotiyosiyanat antikoru ile 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Protein bloke edici serumda inkübasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra hücre yüzeyleri 3 kez 5dk boyunca PBS ile yıkandı. Hücrelerin boyanabilmesi için ilk önce POD converter daha sonra kromojen olarak 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ( İnvitrogen, liquid DAB substrat kit, California, USA) kullanıldı. Boyamalar mikroskop altında kontrollü olarak yapıldı. Lillie-Mayer Hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldıktan sonra Entellan (Merck) ile yapıştırılıp kapatıldı.

### **3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)**

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için flasklara ekilen hücrelerden ilk önce total RNA izolasyonu daha sonra da elde edilen RNA ürünlerinden komplementer DNA sentezi gerçekleştirildi. Bu DNA ürünleri reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumlu SOD1, SOD2 ve GPx gibi oksidatif stres ile ilişkili proteinlerin sentezinden sorumlu mRNA ekspresyonlarının miktarını ölçmek amacıyla kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR'da kullanılacak genlere ait proplar hazır olarak temin edildi. Kullanılacak primer setleri Roche Universal Probe Library' de dizayn edildi.

#### **3.4.1. Total RNA İzolasyonu**

Flasklara ekilen hücreler iki kez yıkandıktan sonra 1 ml PBS eklenip hücreler bir kazıyıcı aracılığı ile yüzeyden kazınıp transfer pipeti ile santrifüj tüpleri içine alınarak 8000 rpm (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı) hızda 2 dk santrifüj edildi. Hücreler çöktürülüp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra mRNA izolasyon kiti (Roche, mRNA isolation kit, version 08) ile ekstraksiyona devam edildi. Hücre kültüründen total RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar uygunlandı;

- 1) Çöktürülen hücreler tekrar 200 µl PBS içinde süspansiyon haline getirildi.
- 2) 400 µl lizis buffer eklenerek 15 saniye vortekslendi.
- 3) Yüksek saflıkta filtre tüplerin içine numunenin transferi için high filter tüp içine collection tüp konulduktan sonra tüm numune high filter tüpün üstündeki toplayıcı kısma konuldu.
- 4) Yüksek saflıkta filtre tüpleri 8000 g (relatif santrifüj kuvveti, g kuvveti) 15 sn santrifüj edildi.



5) Santrifüjden sonra filter tüp ile collection tüp birbirinden ayrılıp altta çöken sıvı uzaklaştırıldı ve filter tüp ile kullanılmış collection tüp tekrar birleştirildi.

6) Filter tüp tekrar birleştikten sonra her örnek için 90 µl DNAase incubation buffer steril reaksiyon tüpü içerisine koyulup 10 µl DNAase 1 eklenip karıştırıldı ve solüsyon filtre tüpün üzerindeki toplayıcı kısımdaki cam filtre örtüsü üzerine boşaltıldı. 21 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edildi.

7) Filtre tüpün üzerindeki rezervuar kısma 500 µl Wash Buffer 1 eklenip, 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filter tüp ile collection tüp birbirinden ayrıldı, altta çöken sıvı uzaklaştırıldı ve filter tüp ile kullanılmış collection tüp tekrar birleştirilir.

8) Filtre tüpün üzerindeki rezervuar kısma 500 µl Wash Buffer 2 eklenip, 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filter tüp ile collection tüp birbirinden ayrıldı, altta çöken sıvı uzaklaştırıldı ve filter tüp ile kullanılmış collection tüp tekrar birleştirilir.

9) Filtre tüpün üzerindeki rezervuar kısma 200 µl Wash Buffer 2 eklenip, 2 dakika maksimum hızda (13000 g) santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filter tüp ile collection tüp birbirinden ayrıldı, altta çöken sıvı uzaklaştırıldı ve filter tüp ile kullanılmış collection tüp tekrar birleştirilir.

10) Collection tüpü uzaklaştırıldı ve filter tüpü steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi.

11) RNA'yı ayırmak için filtre tüpün üzerindeki rezervuar kısma 50 µl Elution Buffer eklenip, 1 dakika 8000 g'de santrifüj edildi.

12) Mikrosantrifüj içinde kalan ve RNA'yı içeren solüsyon cDNA (komplementer DNA) sentezi için kullanıldı.

### **3.4.2. cDNA (komplementer DNA) Sentezi**

1. Elde edilen RNA'lardan ticari olarak hazırlanmış cDNA sentez kiti (Roche, transcriptor first strand cDNA synthesis kit, version 6.0) kullanılarak komplementer DNA elde edildi.

Komplementer DNA sentezinde aşağıdaki prosedür uygulandı;

1) Kullanmadan önce kitin içinde bulunan bütün solüsyonlar çözdürüldü ve hafifçe santrifüj edilerek soğuk buz kalıpları üzerinde kullanılmaya kadar bekletildi.

2) Bütün reaksiyonlar steril, DNAaz ve RNAaz içermeyen ince duvarlı PZR tüpleri içerisinde gerçekleştirildi.

3) PZR tüpleri içine 11 µl total RNA (1 µg), 2 µl random hexamer primer konularak toplam hacim 13 µl'ye tamamlandı.

4) RNA ve primer karışımı termol block ısıtıcı üzerinde 10 dk 65 °C' de denatüre edilip buz üzerinde hemen soğutuldu.

5) RNA ve primer karışımı içeren solüsyon içerisine transcriptor reverse transcriptase reaction buffer (4 µl), protector RNAase inhibitör (0.5 µl), deoxynucleotid mix (2 µl), transcriptor reverse transcriptase (0.5 µl) eklenerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı.

6) Elde edilen karışım hafifçe santrifüj edilerek numunenin PZR tüpü dibinde toplanması sağlandı ve termol block üzerinde 10 dk 25 °C' de ve takiben 60 dk 50 °C' de inkübe edildi.

7) Solüsyon içindeki transcriptor reverse transcriptaz enzimi 85 °C' de 5 dakika tutularak inaktive edildi. Reaksiyon tüpleri buz üzerine alınarak reaksiyon durduruldu. Numunelerin tekrar kullanılabilmesi için -20 °C' de saklandı.

#### **3.4.3. Referans Gen (Housekeeping Gen):**

Çalışmada referans gen olarak beta aktin (ACTB, Roche, version 03, Ref No: 05583055001, Assay Id: 500152) geni kullanıldı. Her numune için mutlaka bir negatif kontrol ve bir referans gen kullanılarak analiz sonuçlarının anlamlı hale getirilmesi sağlandı.

### 3.4.4. Primer Problar

**Tablo 4.** Kullanılacak primer setleri ve özellikleri

mRNA (Gen adı)	Primer	Uzunluk	Pozisyon	Erime Sıcaklığı	Sekans
SOD 1	Left	18	313-330	59	Ggtccagcggatgaaagag
UPL Probe 5	Right	18	373-390	60	Ggacacattggccacacc
SOD 2	Left	20	387-406	60	tggacaaacctgagccctaa
UPL Probe 67	Right	21	443-463	60	gacccaaagtcacgcttgata
GPx 1	Left	21	618-638	59	cgacatgaaccgatataga
UPL Probe 56	Right	20	658-677	60	atgccttaggggtgctagg

Gerçek Zamanlı PZR analizleri için Roche Universal Probe Library'de daha önce dizayn edilmiş hazır halde satın alınan SOD1 (version 03, Ref No: 05532957001, Assay Id: 503225), SOD2 (version 03, Ref No: 05532957001), GPx1 (version 03, Ref No: 05532957001, Assay Id: 503806) genlerine ait problar kullanıldı.

### 3.4.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü

Hedef DNA ya da cDNA'nın amplifikasyonu ve tespit edilebilmesi için Lightcycler Tagman Master Kit (Roche, version 08) kullanıldı. Lightcycler Carousel Based System ile kullanıldığında tanımlanan DNA sekanslarının yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesinde kullanılırlar. Gerçek zamanlı PZR analizi için mRNA üzerinden sentezlenmiş cDNA'lar kullanıldı. Negatif kontrol olarak numunelerle birlikte her zaman cDNA yerine PZR uyumlu su kullanılmıştır. Tagman Master Kit aracılığı ile gerçekleştirilen reaksiyonun prosedürü aşağıda belirtilmiştir.

#### 3.4.5.1. Master Mix'in Hazırlanması

Bir ependorf reaksiyon karışımı (reaction mix, b ependorfu) çözdürüldükten sonra içerisinde enzim bulunan a ependorfu hafifçe santrifüz edildi ve b ependorfu

içerisine a ependorfundan 10 µl konularak pipetasyon yapıldı. Böylelikle içerisinde FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer, MgCl<sub>2</sub> (magnezyum klorür), dNTP (deoksinükleosid trifosfat) bulunan master mix hazırlanmış oldu.

#### **3.4.5.2. PZR Karışımının Hazırlanması (PZR Mix)**

1) İncelenecek numune sayısına bağlı olarak ihtiyaç duyulan sayıda borosilikat camdan yapılmış kapillarlar (Roche, Lightcycler capillaries, 20 µl) daha önce soğutulmuş kapillar soğutma adaptörü içerisine yerleştirildi.

2) LightCycler Taqman Master karışımı (1 nolu ependorf) çözüldükten sonra hafifçe karıştırılıp buz üzerinde tutuldu.

3) 1.5 ml reaksiyon tüpleri içinde her bir örnek için 9 µl PZR dereceli su (2 nolu ependorf), 2 µl primer (0,5 µM konsantrasyonda), ve 4 µl master miks konulup 15 µl'lik PZR karışımı (PCR mix) elde edildi.

4) Her örnek için 15 µl PZR karışımı ve 5 µl kalıp DNA daha önceden soğutulmuş kapillarlar içerisine konuldu ve 3000 rpm'de 5sn santrifüj yapılarak tüm karışımın kapillarların dip kısmında birikmesi sağlanmış oldu.

#### **3.4.5.3. LightCycler Karosele Dayalı Sistemin Protokolü**

LightCycler Taqman Master kitin kullanıldığı LightCycler Karosele Dayalı Sistem pre-inkübasyon (FastStart DNA polimerazın aktivasyonu ve DNA'nın denatürasyonu), hedef DNA'nın amplifikasyonu, rotorun ve termal odanın soğutulması aşamalarını içermektedir.

**Tablo 5.** SOD 1, SOD 2 ve GPx 1 primerlerine uygulanan PZR programı

<b>Programlar</b>			
Program İsmi	Siklus		Analiz Modu
Pre-inkübasyon	1		Hiçbiri
Amplifikasyon	45		Miktar belirtme
Soğutma	1		Hiçbiri
<b>Sıcaklık Hedefi</b>			
Hedef (°C)	Edinme Modu	Uygulama Zamanı	Çıkış Oranı (°C/sn)
<b>Preinkübasyon</b>			
95	Hiçbiri	10 dk	4.4
<b>Amplifikasyon</b>			
95	Hiçbiri	10 sn	4.4
60	Hiçbiri	30 sn	2.2
72	Tek sefer	1 sn	4.4
<b>Soğutma</b>			
40	Hiçbiri	30 sn	2.2

#### **3.4.6. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarının Elde Edilmesi**

Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerine deltametinin oksidatif etkilerinin incelenmesi amacıyla SOD 1, SOD 2 ve GPx genlerine uygun primerler kullanılarak söz konusu gen ekspresyon miktarları ortaya konuldu. Hücre kültürü çalışması sonucunda primer karaciğer hücrelerinden elde edilen mRNA'lerden sentezlenen cDNA'lar üzerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu metodu kullanıldı. Gerçek Zamanlı PZR analizleri sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi amacıyla “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ” formülasyonundan yararlanıldı. Bu formül sayesinde örneklerin yüklenmesi sırasındaki ortaya çıkabilecek miktar farklılıkları nedeniyle sonuçlarda oluşabilecek hataların önüne geçilmiş oldu. Gruplarda meydana gelen ekspresyon oranları gruplarda yer alan kontrol grubu verileri ile karşılaştırılarak elde edilen sonuçlardır. Kontrol gruplarıyla karşılaştırılan bir metodoloji kullanıldığı için yapılan analiz relatif kantitasyon olarak tanımlanır. Hem kontrol grubu hem de çalışma grubundaki hedef genlerin Ct (threshold cycle) değerleri uygun bir referans gen ile normalize edildi. Böylelikle başlangıçta örneklerde bulunan cDNA yoğunlukları farklı olsa dahi sonuçlardaki hata minimize edildi. Gerçek zamanlı PZR analizlerinde ortaya çıkan gen ekspresyonlarının tespit edilmesinde birçok metod kullanılmaktadır. Ekspresyon oranlarının belirlenmesi amacıyla en yaygın kullanılan formül  $\Delta\Delta Ct$ 'dir. Söz konusu formülün bileşenleri;

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta Ct \text{ kontrol}]}$$

$$\Delta Ct (\text{örnek}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}$$

$$\Delta Ct (\text{kontrol}) = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{örnek}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

### 3.5. Birim Alana Düşen Hücre Sayısının Belirlenmesi

Deltametrinin hücre kültürü üzerinde yaptığı diğer bir etki ise hücreler üzerinde nekrotik etki oluşturmasıdır. Ölen primer karaciğer hücrelerin vasat değişimi sırasında yapılan yıkamalar aşamasında plate yüzeyinden koparak vast içerisinde dış ortama atıldığı bilinmektedir. Dolayısı ile birim alana düşen hepatosit sayısı dolaylı olarak grupların deltametrin maruziyetinden ne derece etkilendiklerini gösteren başka bir parametre oluşturmaktadır. Bir mikroskobik alan düşen hücre sayılarının belirlenmesi amacıyla immunositokimyasal inceleme yapmak amacıyla her plateden 20 x objektifle görüntülenip çekilen 10 farklı alandaki toplam hücre sayısının hesaplanması ve her doz için bunların ortalamalarının alınması sonucu hesaplandı.

### 3.6. İstatistiksel Analiz

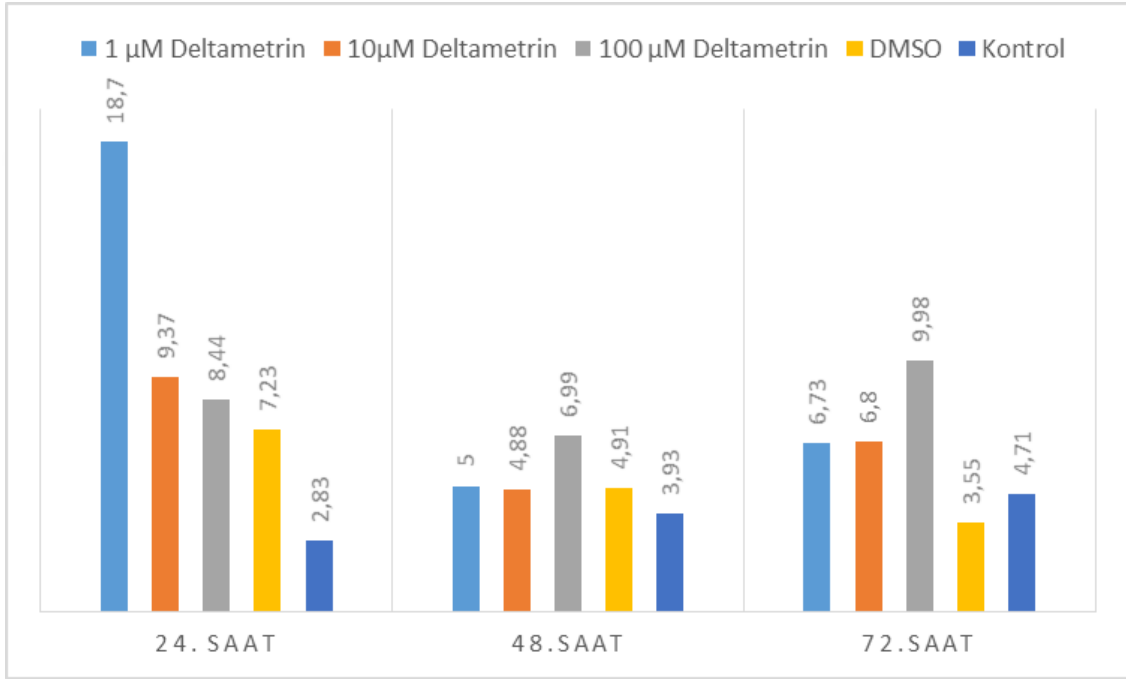
Çalışmada elde edilen immunositokimyasal bulgular Nikon DS-5M kamera ataçmanlı Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu altında görüntülendi ve her grup ve dozlama için 10 farklı alandan 20x objektif ile mikroskobik fotoğrafları çekildi. Pozitif boyanan hücrelerin toplam hücre sayısı içindeki oranları kantitatif olarak hesaplandı. Elde edilen sayısal veriler SPSS v 21 Base lisanslı istatistik analiz programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası farkın istatistik kontrollerinde One-Way ANOVA, grup ortalamalarının karşılaştırmasında Duncan testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarında  $P \leq 0,05$  değeri önemli olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deltamerinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

#### 4.1.1 Caspase 3 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deltamerinin farklı dozlarına maruz bırakılan primer karaciğer hücre kültüründe 24., 48. ve 72. saatlerde caspase 3 ekspresyonu şekil 4’de gösterilmiştir.



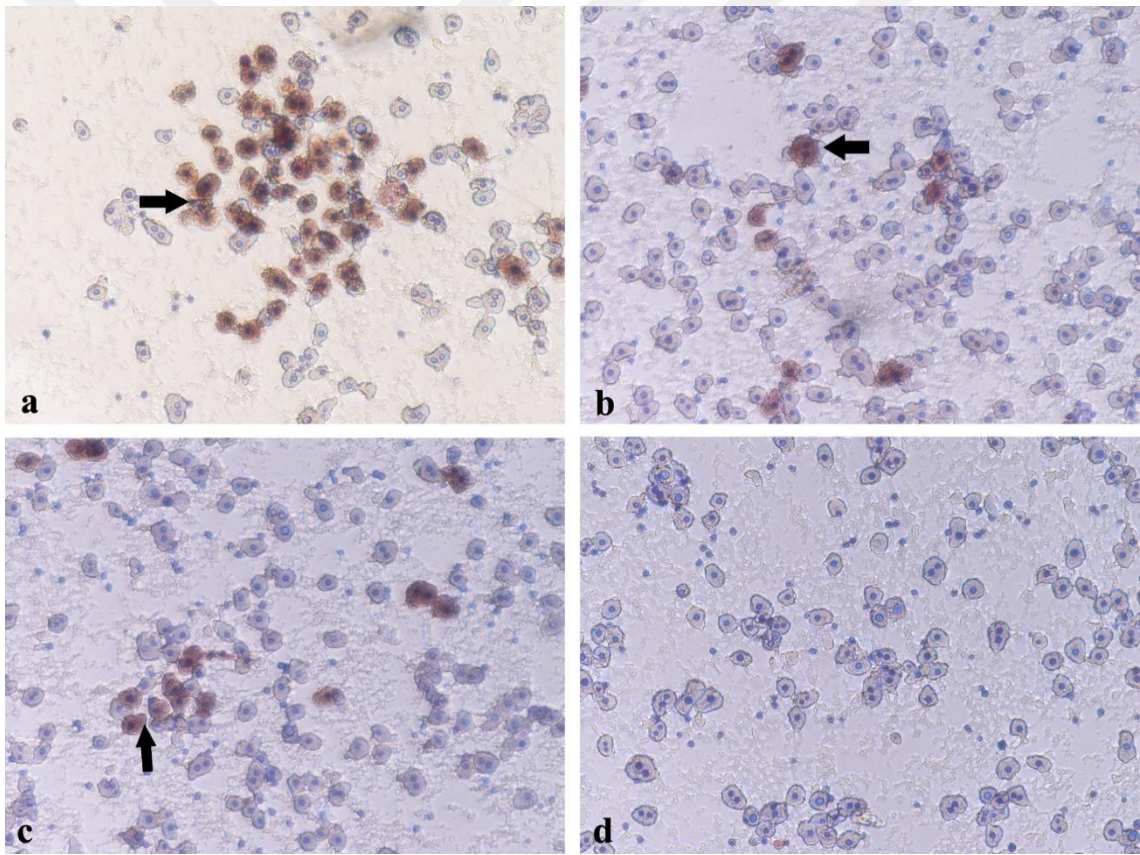
**Şekil 4.** Caspase 3 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

Caspase 3’ün en yüksek ekspresyona 1µM dozda 24. saatte ulaştığı (%18,7), 48. saatte 1 µM dozdaki oranın (%5) 72. saat oranından düşük olduğu (% 6,73), 10 µM dozda caspase 3 ekspresyonun 24. saatte en yüksek orana ulaştığı (% 9,37), 100 µM dozda en yüksek oranın ise 72. saatte gözlemlendi (% 9,98). DMSO grubunda 24. ve 72. saatler arasında gittikçe azalan miktarlarda ekspresyon meydana geldi (sırasıyla % 7.23, % 4.91, % 3.55). Kontrol grubunda ise 24. ve 72. saatler arasında gittikçe artan miktarlarda ekspresyon (sırasıyla % 2.83, % 3.93, % 4.71) tespit edildi (şekil 4). Ancak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu saatler arasında yalnızca 24. saat 1 µM dozuyla 48. saat 1 µM dozu ve 72. Saat 1 µM dozunda elde edilen yüzdelik veriler arasında önem bulundu. Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 6’da

verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ( $P>0.05$ ).

**Tablo 6.** Caspase 3 için saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO-1 $\mu\text{M}$ ( $P=0.034$ )	100 $\mu\text{M}$ -Kontrol ( $P=0.041$ )	DMSO-1 $\mu\text{M}$ ( $P=0.034$ )
DMSO-Kontrol ( $P=0.003$ )		DMSO-10 $\mu\text{M}$ ( $P=0.016$ )
1 $\mu\text{M}$ -Kontrol ( $P=0.001$ )		DMSO-100 $\mu\text{M}$ ( $P=0.030$ )
10 $\mu\text{M}$ -Kontrol ( $P=0.009$ )		DMSO-Kontrol ( $P=0.028$ )
100 $\mu\text{M}$ -Kontrol ( $P=0.015$ )		

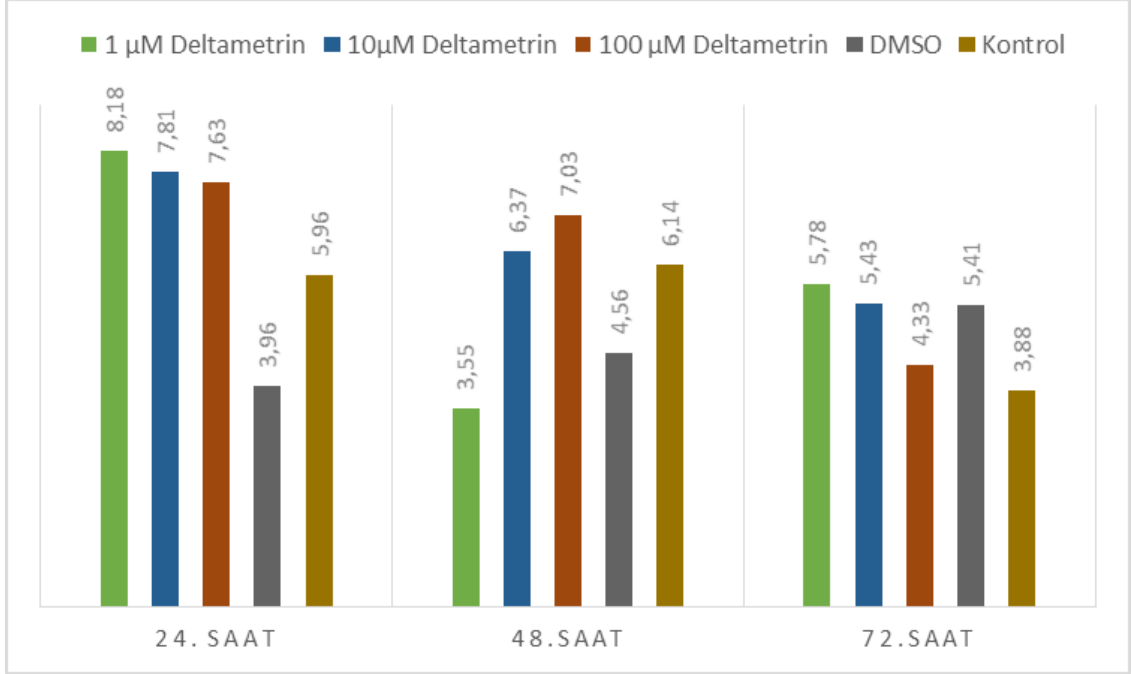


**Sekil 5.** 24. Saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda (a), 48. saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda (b), 72. saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda (c) ve 24. saat kontrol grubunda (d) caspase 3 immunopozitifliği gösteren (ok) hücreler. Bu gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P \leq 0,05$ ). X 20 objektif



#### 4.1.2. Caspase 8 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deltametrinin farklı dozlarına maruz bırakılan primer karaciğer hücre kültüründe 24., 48. ve 72. saatlerde caspase 8 ekspresyonu şekil 6'de gösterilmiştir.



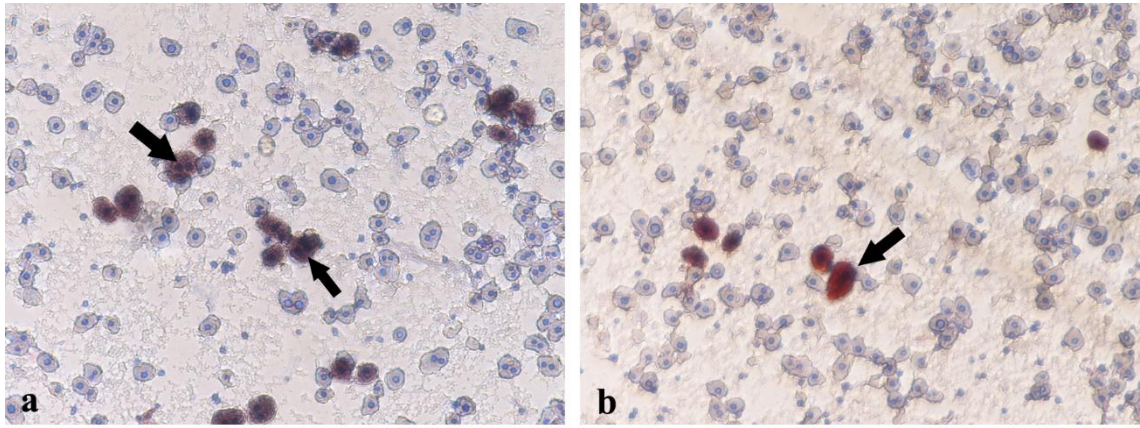
Şekil 6. Caspase 8 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

Caspase 8 ekspresyonunun en yüksek orana 24. Saat 1 µM dozunda ulaştığı gözlemlenmektedir (% 8.18). DMSO ve kontrol grubu haricinde genel olarak 1, 10 ve 100 µM dozlarında en yüksek caspase 8 aktivitesinin 24. saatte meydana geldiği gözlemlenmektedir. 10 ve 100 µM dozlarında 72. saate doğru giderek azalan oranlarda, DMSO grubunda ise 72. saate doğru giderek artan oranda ekspresyon meydana geldiği tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise en yüksek caspase 8 ekspresyonu 48. saatte meydana gelmiştir. 24. saat ekspresyonları değerlendirildiğinde en düşük oranın DMSO grubunda görüldüğü tespit edilmekle birlikte 1 µM dozdan 100 µM doza doğru ekspresyon oranının azaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde doz artışıyla birlikte ekspresyon oranında azalma 72. saat verilerinde de gözlenmektedir. Fakat 48. saat verilerinde doz artışıyla birlikte ekspresyon miktarında da artış gözlenmektedir. 24. ve 48. saat verilerinde DMSO ekspresyon oranlarının kontrol grubundan düşük olduğu gözlenmektedir (şekil 6). Ancak yapılan istatistiki incelemede saatler arasında 1 µM dozunda 24. ve 48. saat oranları arasındaki farkın önemli olduğu belirlendi ( $P \leq 0,05$ )

(One Way Anova). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 7’ de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ( $P>0.05$ ).

**Tablo 7.** Caspase 8 için saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

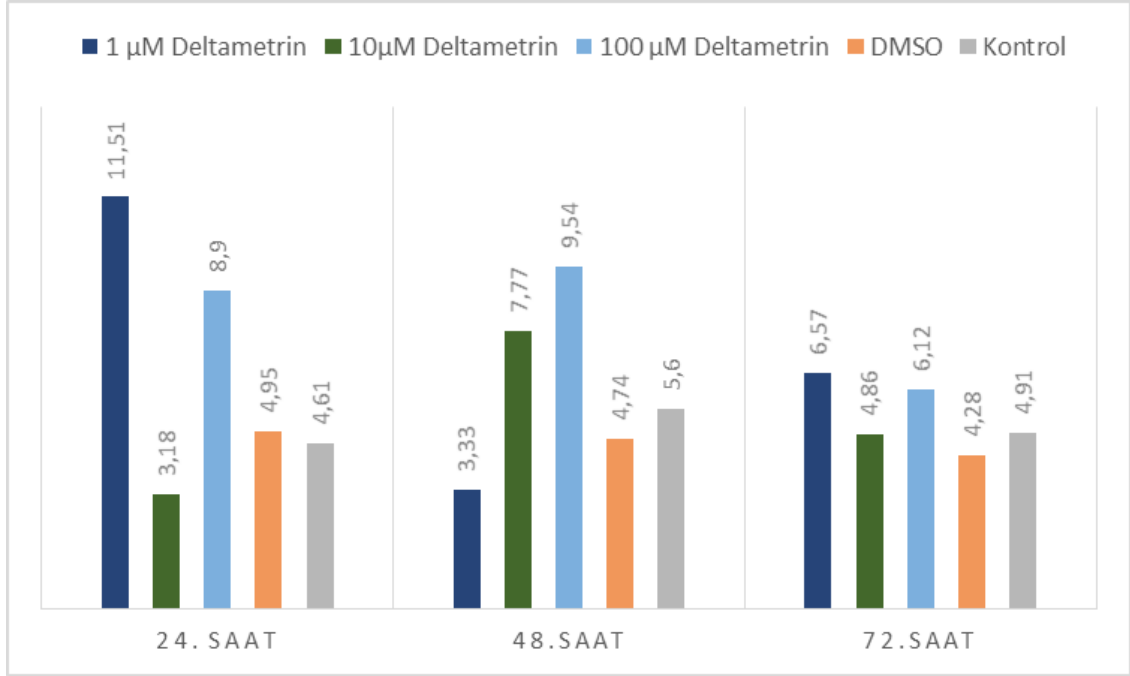
24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
Caspase 8 için elde edilen veriler arasında fark yok.	Caspase 8 için elde edilen veriler arasında fark yok.	Caspase 8 için elde edilen veriler arasında fark yok.



**Şekil 7.** Caspase 8 antikoruyla pozitif boyanan hücreler (ok). 24. Saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda % 8.18 oranında immunopozitiflik gösteren grup (a) ile, 48. Saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda % 3.55 oranında pozitif boyanma gösteren (b) grup. Bu gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P \leq 0,05$ ). X 20 objektif

### 4.1.3. Caspase 9 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deltametrinin farklı dozlarına maruz bırakılan primer karaciğer hücre kültüründe 24., 48. ve 72. saatlerde caspase 9 ekspresyonu şekil 8’de gösterilmiştir.

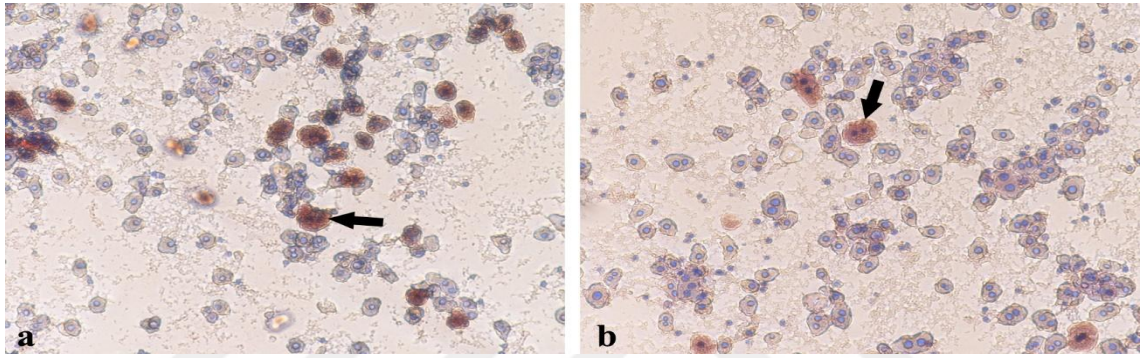


**Şekil 8.** Caspase 9 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

Yapılan immunositokimyasal çalışma sonucunda caspase 9’un en yüksek oranda 24. saatte 1 µM dozunda eksprese edildiği tespit edilmiştir (% 11.51). 10 µM, 100 µM ve kontrol grubunda ise en yüksek ekspresyon oranı 48. saatte açığa çıkarken, DMSO grubunda 72. saate doğru giderek azalan oranda ifade edildiği belirlenmiştir. 24. ve 48. saat verilerinde doz ve zamanla ilişkili olarak anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilememiştir. Fakat 48. saat verilerinde doz artışıyla birlikte caspase 9 ekspresyon miktarının arttığı gözlenmektedir. 48. ve 72. Saat verilerinde DMSO grubunun caspase 9 ekspresyon oranlarının kontrol grubunda düşük olduğu saptanmıştır (şekil 8). Ancak yapılan istatistiki incelemede saatler arasında 1 µM dozunda 24. ve 48. saat oranları arasındaki farkın ve 10 µM dozunda 24., 48. ve 72. saatteki oranları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlendi ( $P \leq 0,05$ ) (One-Way Anova). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 8’ de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 8.** Caspase 9 için saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

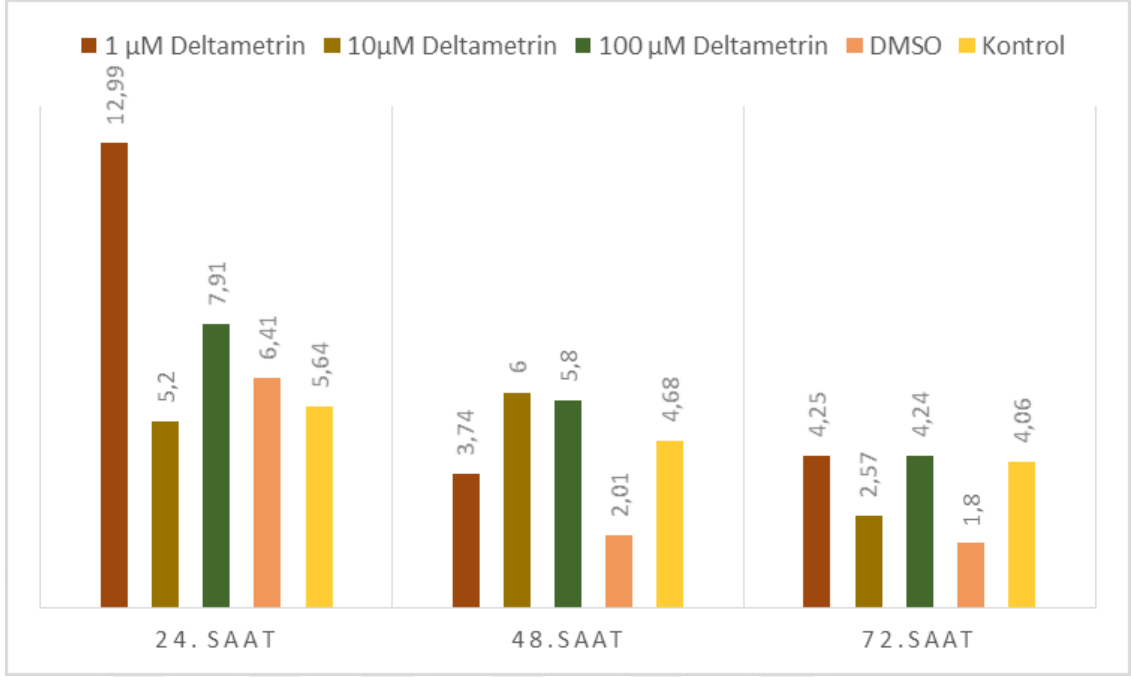
24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.034)	DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.019)	Caspase 9 için elde edilen veriler arasında fark yok.
DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.042)	DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.021)	
1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.034)	DMSO - Kontrol (P=0.035)	
	1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.006)	
	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.013)	
	1 $\mu$ M - Kontrol (P=0.023)	



**Şekil 9.** Caspase 9 antikoruyla pozitif boyanan hücreler (ok). 24. Saat 1  $\mu$ M dozunda % 11.51 oranında immunopozitiflik gösteren grup (a) ile, 48. Saat 1  $\mu$ M dozunda % 3.33 oranında pozitif boyanma gösteren (b) grup. Bu gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P \leq 0,05$ ). X 20 objektif

#### 4.1.4. TUNEL Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Apoptozisin son aşamalarında meydana gelen DNA fragmentasyonunun gösterilmesi prensibine dayanan TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling) metodu kullanılarak apoptotik sürecin gerçekleştiği hücreler tespit edildi. Deltametinin farklı dozlarına maruz bırakılan primer karaciğer hücre kültüründe 24., 48. ve 72. saatlerde TUNEL reaksiyonu oranları şekil 10'de gösterilmiştir.

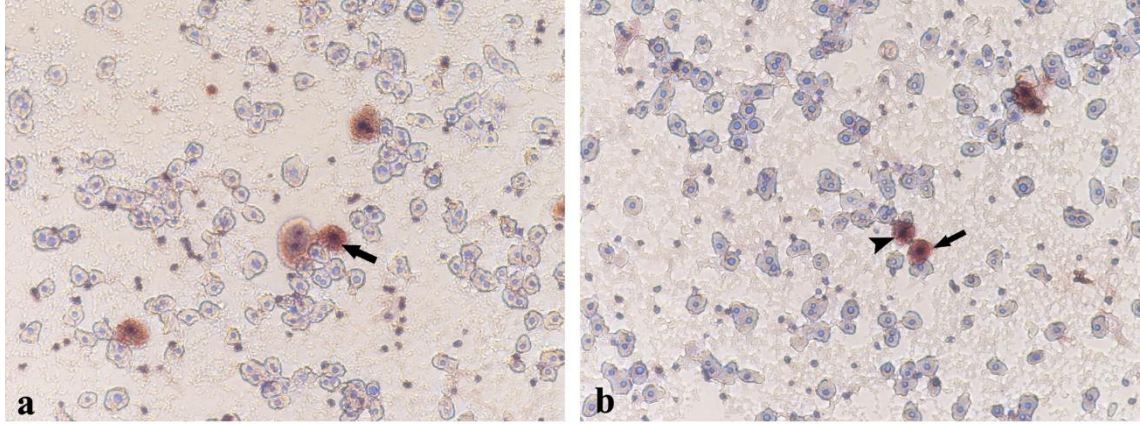


**Şekil 10.** TUNEL reaksiyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

TUNEL pozitif hücre sayısının en fazla oranda 24. Saat 1 µM dozunda olduğu gözlemlendi (% 12.99). 10 µM dozunda en yüksek reaksiyonun 48. saatte gerçekleştiği, 100 µM, DMSO ve Kontrol gruplarında ise 72. saate doğru gittikçe azalan oranlarda ekspresyon gerçekleştiği gözlemlendi. Tüm uygulama saatleri için yapılan doz ve ekspresyon miktarlarında arasında anlamlı veriler elde edilememiştir. 48. saat verilerinde 1 µM dozunda meydana gelen TUNEL reaksiyonun aynı saat kontrol grubu oranından düşük olması dikkati çekmektedir. 48. saat ve 72. saat DMSO grubu TUNEL reaksiyonu oranlarının kontrol grubu oranlarından düşük olduğu saptanmıştır (şekil 10). Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda saatler arasında, 1 µM dozunda 24 saat verilerinin 48 ve 72. saatte elde edilen veriler arasında önem olduğu, 10 µM dozunda ise 24. saat ve 48. saat arasındaki oranların ve 48. saat ve 72. saat arasındaki oranların önemli olduğu, ayrıca DMSO grubunda 24. saat verileri ile 48. saat ve 72. saat verileri arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi ( $P \leq 0,05$ ). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 9' de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 9.** TUNEL reaksiyonunda saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.013)	DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.003)	DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.044)
DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.003)	DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.004)	DMSO - Kontrol (P=0.029)
DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.014)	DMSO - Kontrol (P=0.013)	10 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.038)
DMSO - Kontrol (P=0.012)		
1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.001)		
1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.009)		
1 $\mu$ M - Kontrol (P=0.006)		



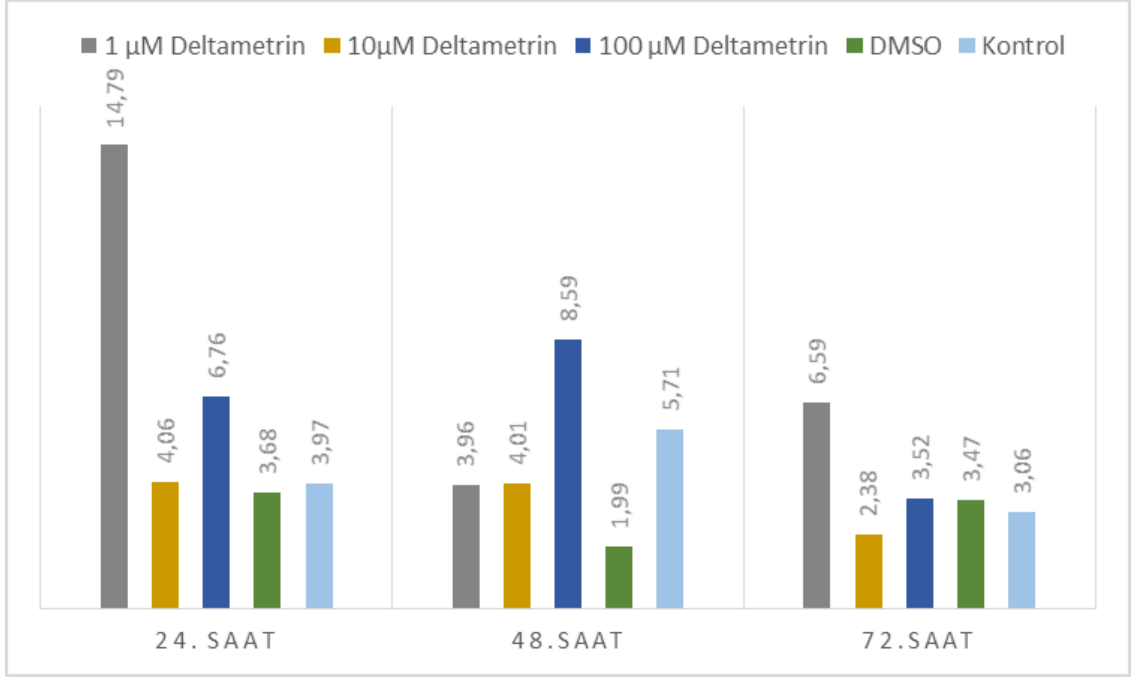
**Şekil 11.** TUNEL metoduyla pozitif boyanan hücreler (ok). 24. Saat 10  $\mu$ M dozunda % 5.2 oranında immunopozitiflik gösteren grup (a) ile, 24. Saat 100  $\mu$ M dozunda % 7.91 oranında pozitif boyanma gösteren (b) grup. TUNEL ile pozitif boyanan hücrenin çekirdeğinde morfolojik değişiklik (mitotik figüre ?) (ok başı). Bu gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05). X 20 objektif

#### **4.2. Deltamerinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü Üzerine Oksidatif Etkilerinin İncelenmesi**

Deltamerinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerinde meydana getirdiği oksidatif etkilerinin incelenmesi amacıyla Süperoksit Dismutaz 1 (SOD 1), Süperoksit Dismutaz 2 ve Glutasyon peroksidaz 1 ekspresyonları immunositokimyasal boyama metodu ve konusu enzimlerin sentezlenmesine neden olan mRNA miktarlarının tespit edilmesine yönelik olarak Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rt-PZR) kullanıldı.

#### 4.2.1. Süperoksit Dismutaz 1 (SOD 1) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

SOD1 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak ekspresyon oranları şekil 12’de gösterilmiştir. Deltametrinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerindeki oluşturduğu oksidatif strese rol oynayan SOD 1’in 24., 48. ve 72. saatlerdeki ekspresyonu incelendiğinde pozitif hücre sayısının en fazla oranda 24. saatte 1  $\mu$ M doz uygulanan grupta olduğu (14,79) gözlemlendi.



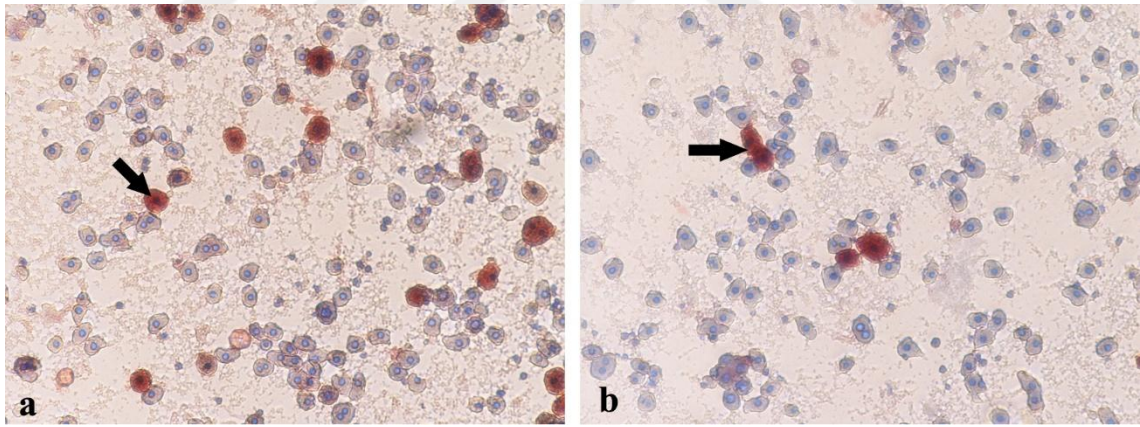
Şekil 12. SOD 1 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

24. saat ve 72. Saat SOD1 ekspresyon oranlarında doz ve ekspresyon miktarları arasında anlamlı bir ilişki gözlenememesine rağmen 48. saat verilerinde doz artışıyla birlikte SOD1 ekspresyon oranların arttığı saptanmıştır. 48. saat kontrol grubu oranlarının 48. saat 1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M dozunda elde edilen oranlardan ve 72. saat kontrol grubu oranının 72. saat 10  $\mu$ M dozunda elde edilen orandan yüksek olması dikkati çekmektedir. 24. Saat ve 48. Saat DMSO grubu ekspresyon oranlarının aynı saatlerdeki kontrol grubu oranlarından düşük olduğu gözlenmektedir. 100  $\mu$ M ve Kontrol grubunda en yüksek reaksiyonun 48. saatte gerçekleştiği, 10  $\mu$ M grubunda ise 72. saate doğru gittikçe azalan oranlarda ekspresyon gerçekleştiği gözlemlendi (şekil 12). Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda saatler arasında, 1  $\mu$ M dozunda 24. saat verilerinin 48. ve 72. saatte elde edilen veriler arasında anlam olduğu, 100  $\mu$ M dozunda ise 24. saat ve 48. oranların 72. saat arasındaki oranların, ayrıca kontrol grubundaki 24., 48. ve 72.

saat verileri arasında verilerin anlamlı olduğu tespit edildi ( $P \leq 0,05$ ). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 10' de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 10.** SOD 1 ekspresyonunda saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO - 1 $\mu$ M ( $P=0.000$ )	DMSO - 100 $\mu$ M ( $P=0.000$ )	DMSO - 10 $\mu$ M ( $P=0.031$ )
DMSO - 10 $\mu$ M ( $P=0.001$ )	DMSO - Kontrol ( $P=0.000$ )	1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M ( $P=0.012$ )
DMSO - 100 $\mu$ M ( $P=0.001$ )	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M ( $P=0.001$ )	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M ( $P=0.024$ )
DMSO - Kontrol ( $P=0.001$ )	1 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.002$ )	1 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.037$ )
1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M ( $P=0.010$ )	10 $\mu$ M - 100 $\mu$ M ( $P=0.000$ )	
1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M ( $P=0.022$ )	10 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.001$ )	
1 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.006$ )	100 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.096$ )	
100 $\mu$ M - Kontrol ( $P=0.038$ )		

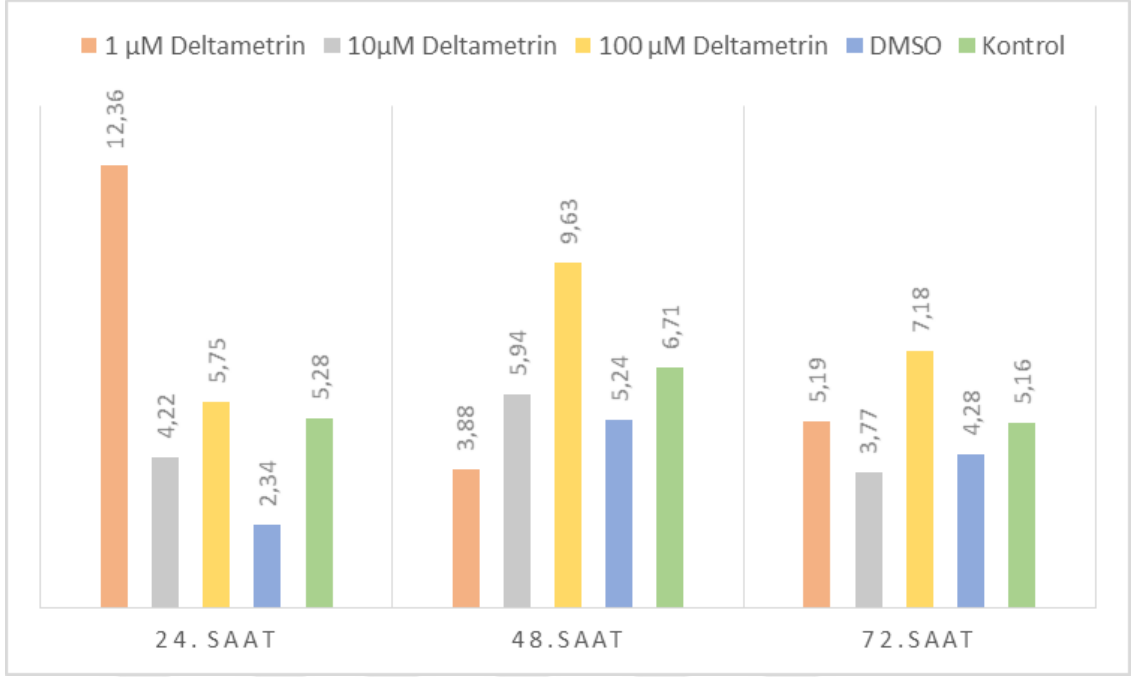


**Şekil 13.** SOD 1 antikoruyla pozitif boyanan hücreler (ok). Grup içinde en yüksek oranda ekspresyon gösteren 24. Saat 1  $\mu$ M grubu (a) ile 72. saat kontrol grubuna ait fotolar. Bu gruplar arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P \leq 0,05$ ). X 20 objektif

#### 4.2.2. Süperoksit Dismutaz 2 (SOD 2) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

SOD2 ekspresyonunun doz ve zaman bağlı olarak değişen ekspresyon oranları şekil 14'te gösterilmiştir. Deltametrinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerindeki oluşturduğu oksidatif strese rol oynayan SOD 2'nin 24., 48. ve 72. saatlerdeki ekspresyonlarına bakıldığında SOD2 pozitif hücre sayısının en fazla oranda 24. saatte 1  $\mu$ M doz uygulanan grupta olduğu (%12,36) dikkati çekti.



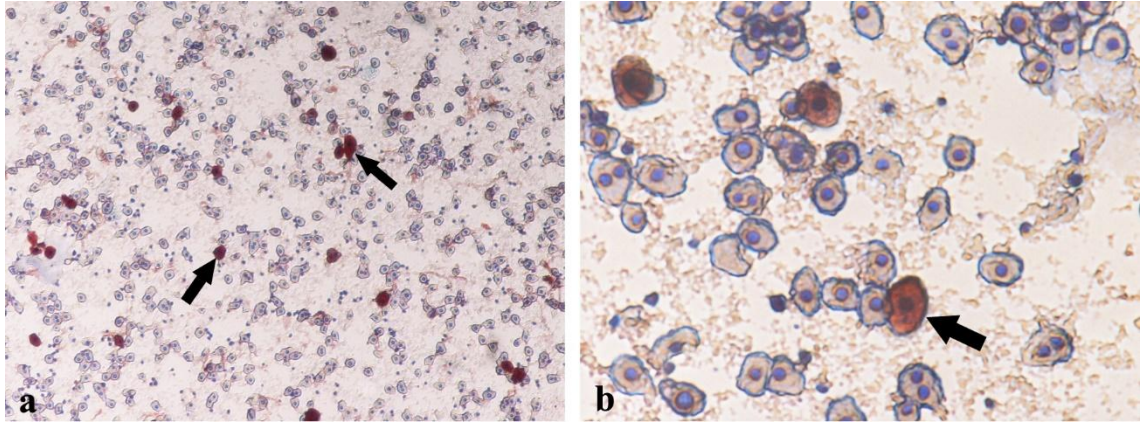


**Şekil 14.** SOD 2 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

24. saat 1 µM dozu haricinde diğer tüm dozlamalarda 48. saat verilerin daha yüksek olduğu, 24. ve 72. saat verilerin genel olarak birbirine yakın veriler ortaya çıkardığı görülmekle birlikte uygulanan dozlar ve meydana gelen ekspresyon oranları arasında anlamlı bir ilişki gözlenemedi. 48. saat verilerinde ise doz artışı ile birlikte SOD2 ekspresyon oranlarının arttığı belirlendi. Kontrol grubu oranlarının 24. ve 72. saatte 10 µM dozundan, 48. saatte ise hem 1 µM hem de 10 µM dozundan yüksek ekspresyon oranlarına sahip olması dikkati çekti. DMSO grubu SOD2 ekspresyon oranlarının tüm uygulama saatlerinde kontrol grubundan düşük olduğu gözlemlendi (şekil 14). Yapılan istatistikî değerlendirme sonucunda 1 µM dozunda 24 saat verilerinin 48 ve 72. saatte elde edilen veriler arasında ve kontrol grubunun 24. ve 48. saat verileri arasında önem olduğu belirlendi ( $P \leq 0,05$ ). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 11’ de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 11.** SOD 2 ekspresyonunda saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

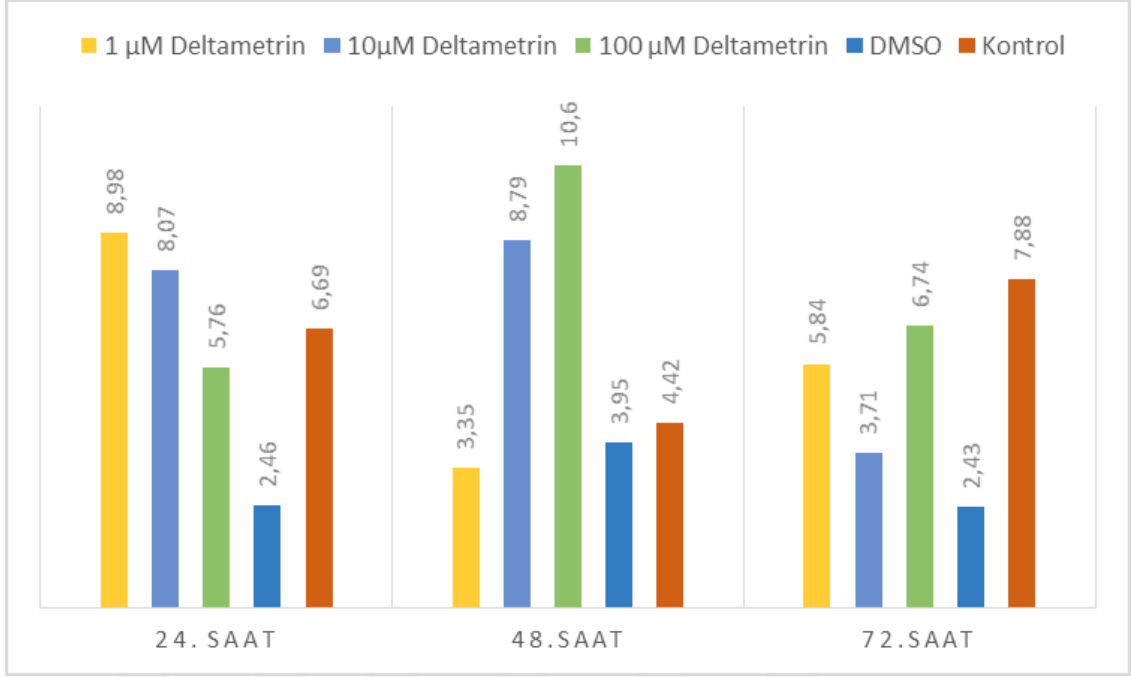
24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.000)	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.046)	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.048)
DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.000)	1 $\mu$ M - Kontrol (P=0.044)	10 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.016)
DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.000)		10 $\mu$ M - Kontrol (P=0.029)
DMSO - Kontrol (P=0.000)		
1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.001)		
1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.002)		
1 $\mu$ M - Kontrol (P=0.004)		



**Şekil 15.** SOD 2 antikoruyla pozitif boyanan hücreler (ok). 24. Saat 100  $\mu$ M grubu 10x objektif (a) ve 40x objektif (b)

#### 4.2.3. Glutatyon Peroksidaz 1 (GPx 1) Aktivitesinin Değerlendirilmesi

GPx ekspresyonunun doz ve zamana bağlı değişim değerleri şekil 16'da gösterilmiştir. Deltametrinin Primer Karaciğer Hücre Kültürü üzerindeki oluşturduğu oksidatif strese rol oynayan GPx'in 24., 48. ve 72. saatlerdeki ekspresyonu incelendiğinde; GPx pozitif hücre sayısının en fazla oranda 48. Saatte 100  $\mu$ M doz uygulanan grupta olduğu dikkati çekti.

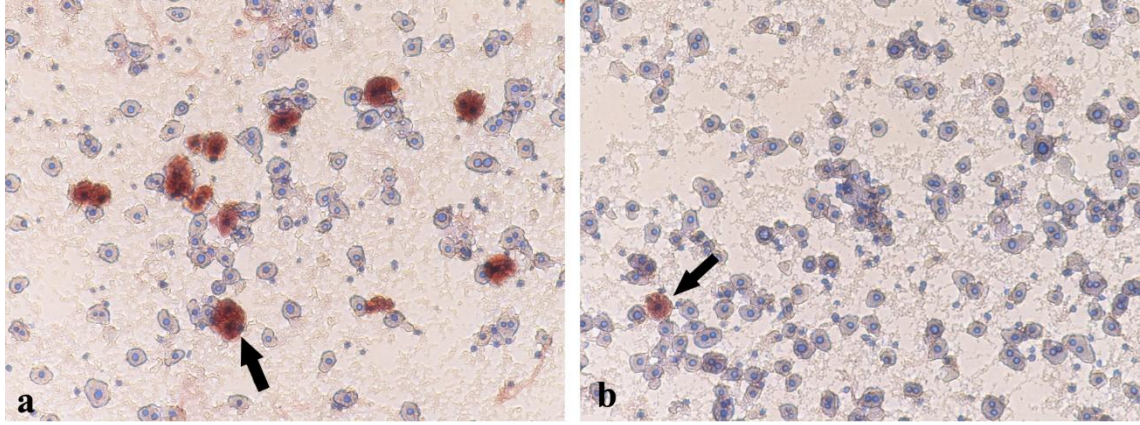


**Şekil 16.** GPx 1 ekspresyonunun doz ve zamana bağlı olarak değişimin yüzdelik (pozitif boyanan hücre sayısı/toplam hücre sayısı) değerleri

24. saat verilerinde doz artışı ile birlikte ekspresyon oranlarının azaldığı gözlemlendi. 48. Saat verilerinde ise tam tersi olarak doz artışı ile birlikte GPx 1 ekspresyon oranlarının arttığı tespit edildi. 48. saat 10 µM, 100 µM ve DMSO grubuna ait verilerin diğer saatlerdeki oranlardan daha yüksek olduğu, 1 µM dozunda en yüksek ekspresyonun 24. saatte meydana geldiği, kontrol grubu verilerinin ise 72. saatte en yüksek seviyede olduğu dikkati çekti. Tüm uygulama saat verilerinde DMSO grubu ekspresyon oranlarının kontrol gruplarından düşük seviyede olduğu saptandı (şekil 16). İstatistiki inceleme sonucu saatler arasında, 1 µM dozunda 24., 48. ve 72. saat verilerinin anlamlı bulunduğu, 10 µM dozunda 24. saat ve 48. saat verilerinin 72. Saat verileri anlamlı olduğu, 100 µM dozuyla ilgili 24. saat verileriyle 48. saat ve 72. saat verileri arasında anlam olduğu ve kontrol grubunda 48. Saat ve 72. Saat verilerinin birbiriyle anlamlı olduğu belirlendi ( $P \leq 0,05$ ). Ayrıca saatlere göre grup içindeki farklar incelendiğinde tablo 12' de verilen gruplar haricinde uygulama saatleri içindeki diğer dozlardaki oranlar arasındaki farkın önemsiz olduğu tespit edildi ( $P > 0,05$ ).

**Tablo 12.** GPx 1 ekspresyonunda saatlere göre grup içindeki farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

24. saat verileri	48. saat verileri	72. saat verileri
DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.021)	DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.001)	DMSO - 1 $\mu$ M (P=0.005)
DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.009)	DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.000)	DMSO - 10 $\mu$ M (P=0.013)
DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.016)	DMSO - Kontrol (P=0.000)	DMSO - 100 $\mu$ M (P=0.002)
DMSO - Kontrol (P=0.023)	1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.001)	DMSO - Kontrol (P=0.001)
	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.002)	1 $\mu$ M - 10 $\mu$ M (P=0.041)
	1 $\mu$ M - Kontrol (P=0.001)	1 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.037)
	10 $\mu$ M - Kontrol (P=0.006)	10 $\mu$ M - 100 $\mu$ M (P=0.021)
	100 $\mu$ M - Kontrol (P=0.007)	10 $\mu$ M - Kontrol (P=0.045)



**Şekil 17.** GPx antikoruyla pozitif boyanan hücreler (ok). Grup içinde en yüksek seviyede ekspresyon gözlenen 48. Saat 100  $\mu$ M grubu ile grup içinde en düşük ekspresyonun gözlendiği 72. Saat DMSO grubu. Gruplar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ( $P \leq 0,05$ ). 20x objektif.

**Tablo 13.** Apoptotik ve oksidatif etkilerin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler

Grup	Doz	Uygulama Sonrası İncelenen Saat		
		24. saat	48. saat	72. saat
Caspase 3	1 µM	18,7	5	6,73
	10µM	9,37	4,88	6,8
	100 µM	8,44	6,99	9,98
	DMSO	7,23	4,91	3,55
	Kontrol	2,83	3,93	4,71
Caspase 8	1 µM	8,18	3,55	5,78
	10µM	7,81	6,37	5,43
	100 µM	7,63	7,03	4,33
	DMSO	3,96	4,56	5,41
	Kontrol	5,96	6,14	3,88
Caspase 9	1 µM	11,51	3,33	6,57
	10µM	3,18	7,77	4,86
	100 µM	8,9	9,54	6,12
	DMSO	4,95	4,74	4,28
	Kontrol	4,61	5,6	4,91
TUNEL	1 µM	12,99	3,74	4,25
	10µM	5,2	6	2,57
	100 µM	7,91	5,8	4,24
	DMSO	6,41	2,01	1,8
	Kontrol	5,64	4,68	4,06
SOD 1	1 µM	14,79	3,96	6,59
	10µM	4,06	4,01	2,38
	100 µM	6,76	8,59	3,52
	DMSO	3,68	1,99	3,47
	Kontrol	3,97	5,71	3,06
SOD 2	1 µM	12,36	3,88	5,19
	10µM	4,22	5,94	3,77
	100 µM	5,75	9,63	7,18
	DMSO	2,34	5,24	4,28
	Kontrol	5,28	6,71	5,16
GPx 1	1 µM	8,98	3,35	5,84
	10µM	8,07	8,79	3,71
	100 µM	5,76	10,6	6,74
	DMSO	2,46	3,95	2,43
	Kontrol	6,69	4,42	7,88

Deltametrin uygulamasına bağlı olarak karaciğer hücre kültürü üzerinde oluşması beklenen apoptotik ve oksidatif süreçlere ilişkin olarak incelenen proteinlerin ekspresyonlarının saatlere göre gruplar arasındaki farkların belirlenmesine yönelik olarak yapılan istatistiki çalışma sonucunda Tablo13’ de gösterilen gruplar arasındaki verilerin anlamlı olduğu ( $P \leq 0,05$ ), ancak Tablo 13’ de verilen gruplar haricinde uygulama saatlerine göre gruplar arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlendi ( $P>0,05$ ).

**Tablo 14.** Saatlere göre gruplar arası farkların istatistiksel önemini gösterir tablo

Doz	24. saat	48. saat	72. saat
1 µM	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Elde edilen veriler arasında önem yok.
10 µM	Cas 3 - Cas 9 (P=0.007) Cas 3 - GPx 1 (P=0.010) Cas 3 - Sod 1 (P=0.012) Cas 3 - Sod 2 (P=0.002) Cas 3 - TUNEL (P=0.003) Cas 8 - Cas 9 (P=0.005) Cas 8 - GPx 1 (P=0.006) Cas 8 - SOD 1 (P=0.011) Cas 8 - SOD 2 (P=0.003) Cas 8 - TUNEL (P=0.004) Cas 9 - GPx 1 (P=0.008) Cas 9 - SOD 1 (P=0.026) Cas 9 - SOD 2 (P=0.026) Cas 9 - TUNEL (P=0.014) GPx 1 - SOD 1 (P=0.049) GPx 1 - SOD 2 (P=0.049) GPx 1 - TUNEL (P=0.025)	Cas 3 - GPx 1 (P=0.052) Cas 3 - Sod 1 (P=0.001) Cas 3 - Sod 2 (P=0.001) Cas 3 - TUNEL (P=0.002) Cas 8 - SOD 1 (P=0.001) Cas 8 - SOD 2 (P=0.002) Cas 8 - TUNEL (P=0.003) Cas 9 - SOD 1 (P=0.000) Cas 9 - SOD 2 (P=0.000) Cas 9 - TUNEL (P=0.001) GPx 1 - SOD 1 (P=0.000) GPx 1 - SOD 2 (P=0.001) GPx 1 - TUNEL (P=0.001) SOD 1 - SOD 2 (P=0.017) SOD 1 - TUNEL (P=0.014)	Elde edilen veriler arasında önem yok.
100 µM	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Cas 3 - Cas 8 (P=0.049) Cas 3 - Sod 1 (P=0.017) Cas 3 - Sod 2 (P=0.012) Cas 3 - TUNEL (P=0.007) Cas 8 - SOD 1 (P=0.023) Cas 8 - SOD 2 (P=0.011) Cas 8 - TUNEL (P=0.008) Cas 9 - SOD 1 (P=0.015) Cas 9 - SOD 2 (P=0.013) Cas 9 - TUNEL (P=0.006) GPx 1 - SOD 1 (P=0.005) GPx 1 - SOD 2 (P=0.005) GPx 1 - TUNEL (P=0.003) SOD 1 - SOD 2 (P=0.007) SOD 1 - TUNEL (P=0.015) SOD 2 - TUNEL (P=0.038)
DMSO	GPx 1 - TUNEL (P=0.025) SOD 2 - TUNEL (P=0.023)	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Elde edilen veriler arasında önem yok.
Kontrol	Cas 3 - Cas 8 (P=0.049) Cas 3 - GPx 1 (P=0.034) Cas 3 - SOD 1 (P=0.043) Cas 3 - SOD 2 (P=0.046)	Elde edilen veriler arasında önem yok.	Cas 3 - Sod 1 (P=0.021) Cas 3 - Sod 2 (P=0.028) Cas 3 - TUNEL (P=0.022) Cas 8 - GPx 1 (P=0.039) Cas 8 - SOD 1 (P=0.010) Cas 8 - SOD 2 (P=0.014) Cas 8 - TUNEL (P=0.011) Cas 9 - SOD 1 (P=0.008) Cas 9 - SOD 2 (P=0.012) Cas 9 - TUNEL (P=0.008) GPx 1 - SOD 1 (P=0.006) GPx 1 - SOD 2 (P=0.007) GPx 1 - TUNEL (P=0.005) SOD 1 - SOD 2 (P=0.041)

### 4.3. Birim Alana Düşen Hücre Sayıları

**Tablo 15.** Bir mikroskopik alana düşen hücre sayıları (20x objektif için)

Doz	Uygulama Saatleri			Dozların ort. sayı.
	24. Saat	48. Saat	72. Saat	
1 $\mu$ M	132,37	107,8	100,82	113,66
10 $\mu$ M	97,37	97,57	102,47	99,13
100 $\mu$ M	87,82	81,85	91,91	87,19
DMSO	94,27	111,44	98,2	101,3
Kontrol	90,02	108,27	98,21	98,83
Grup Ort.	100,37	101,38	98,32	

Genel olarak 48. Saat grup ortalamasının (101,38) 24. (100,37) ve 72. (98,32) saat ortalamalarından fazla olduğu gözlemlendi. 24. Saat 1  $\mu$ M dozunda bir mikroskopik alana düşen hücre sayısının (132,37) diğer doz ve saatlerdeki hücre yoğunluklarından fazla olduğu tespit edildi. Ayrıca 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M dozlarındaki ortalama hücre sayıları incelendiğinde (sırasıyla 113.66, 99.13, 87.19) deltametrinin dozundaki artışla birlikte hücre sayılarında azalma meydana geldiği belirlendi. Yine hücre kültürlerinin dondurulması aşamasında kryoprotektif özelliğinden dolayı sık şekilde kullanılan DMSO verilen grubun ortalama hücre sayısının kontrol grubundan fazla olduğu tespit edildi.

#### 4.4. Gerçek Zamanlı PZR Analiz Sonuçları

Gerçek Zamanlı PZR Analizleri sonucunda gruplar arasında oksidatif strese rol oynayan SOD1, SOD2 ve GPx 1 enzimlerinin ekspresyon miktarları belirlendi. Söz konusu enzimlere ait ekspresyon oranları Tablo 16’da gösterilmiştir.

**Tablo 16.** SOD 1, SOD 2 ve GPx 1 Genlerinin İfade oranlarını gösterir tablo

Zaman	Doz	SOD 1 Ekspresyon Oranları	SOD 2 Ekspresyon Oranları	GPx 1 Ekspresyon Oranları
24. saat	1 µM	88,03	veri yok	72,5
24. saat	10 µM	5,85	veri yok	24,59
24. saat	100 µM	10,55	veri yok	4,85
24. saat	DMSO	1,89	1,69	3,97
24. saat	Kontrol	1	1	1
48. saat	1 µM	4	veri yok	0,08
48. saat	10 µM	5,65	19,29	1,6
48. saat	100 µM	veri yok	veri yok	4,22
48. saat	DMSO	7,78	5,97	4,78
48. saat	Kontrol	1	1	1
72. saat	1 µM	5,02	veri yok	veri yok
72. saat	10 µM	12,81	veri yok	veri yok
72. saat	100 µM	6,49	veri yok	veri yok
72. saat	DMSO	veri yok	veri yok	veri yok
72. saat	Kontrol	1	veri yok	veri yok



SOD 1 geninin en yüksek oranda 24. Saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda ortaya çıktığı, 100  $\mu\text{M}$  dozunda da 24. Saat verilerinin yüksek olduğu, ancak 10  $\mu\text{M}$  dozunda 72. saat verilerinin daha yüksek olduğu tespit edildi. Genel olarak 24. Saat gen ekspresyon oranının 48. Ve 72. Saatten daha yüksek olduğu görüldü. 48. Saat 100  $\mu\text{M}$  dozunda ve 72. Saat DMSO uygulanan grupta herhangi bir veri alınamadı.

SOD 2 gen ifadesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak veri alınamamıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 48. Saatteki 19,29 ve DMSO grubundaki 5,97 kat fazla gen ekspresyonun olduğu dikkat çekicidir (tablo 16).

GPx 1 geninin en yüksek miktarda 24. saat 1  $\mu\text{M}$  dozunda eksprese edildiği tespit edildi. 24. saat grup verilerinin 48. Saat verilerin fazla olduğu ayrıca 72. Saatte verilen hiçbir dozdan veri alınmadığı belirlendi. 24. Saat verilerinde 1  $\mu\text{M}$  dozdan 100  $\mu\text{M}$  doza doğru gittikçe azalan bir ekspresyon gözlemlendi.

#### 4. TARTIŞMA

“*Chrysanthemum cinerariifolium*” bitkisinin çiçeklerinin baş kısmından elde edilen deltametrik asit oldukça yüksek insektisidal aktivite (DDTx35.000) ve memeliler için oldukça düşük toksisiteye sahiptir (Krief ve ark., 2009). Anadon ve ark., (1996) deltametrinin lipofilik özellikte olduğu, bu nedenle bir kez emildikten sonra hızlı bir şekilde dolaşıma geçtiği ve sahip oldukları lipofilik özelliğinin başta merkezi sinir sistemi (MSS) dokuları olmak üzere birçok dokuya deltametrinin dağılımını kolaylaştırdığı belirtilmektedir. Biyolojik katalizör olarak görev yapan enzimlerin vücuttaki tüm enzimatik reaksiyonları kontrol ettiği, bu nedenle çeşitli enzim seviyelerindeki nitel ve nicel değişikliklerin sağlık ve hastalık belirtisi olabileceği belirtilmektedir (Mongi ve ark., 2011).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından (WHO, 2001) yapılan çalışmada dişi sıçanlara ortalama 2.4 mg/kg dozda tek sefer intravenöz yolla deltametrin verilmiştir. Radyolojik olarak işaretlenmiş idrar, dışkı ve seçilmiş organ ve dokulardaki konsantrasyonları 1, 4, 24, 120. Saatlerde ölçülmüştür. İntravenöz uygulamadan bir saat sonra kanda 3.0 µg/g konsantrasyonda; daha yüksek konsantrasyonlarda karaciğerde (6.0 µg/g), böbrekte (3.1 µg/g) ve ovaryumda (4.0 µg/g) bulunduğu, daha düşük konsantrasyonlarda ise (0.22 - 0.33 µg/g. aralığında değişen değerlerde) beyin, spinal kordun servikal, torasik ve lomber bölgelerinde bulunduğu bildirilmiştir.

Deltametrin ve diğer piretroit insektisitler üzerine yapılan çalışmaların büyük kısmı *in vivo* çalışmaları içermektedir. Karaciğer piretroit metabolizmasında temel rol oynayan bir organ olduğu için birçok metabolitin yüksek konsantrasyonda biriktiği bir yerdir ( Richard ve Brodie, 1985). Dişi sıçanlarda yapılan çalışmalarda da intravenöz olarak uygulanan deltametrinin en yüksek konsantrasyona karaciğerde ulaştığı bildirilmiştir (WHO, 2001). Sunulan çalışma *in vivo* şartlarda en çok etkilenen organ olan karaciğerin parenkim hücreleri olan hepatositlerin göstermiş olduğu oksidatif strese karşı reaksiyonu ve apoptotik süreçte yer alan mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Deltametrinin metabolik yolağında sitokrom P450 monoksijenaz enzimi başta olmak üzere birçok ksenobiyotik metabolize edici enzimin rol aldığı bilinmektedir (Catinot ve ark., 1989). Tek doz sipermetrin (25g/kg) ve fenvalerate (4.5g/kg)' e maruz

kalan sıçanlarda antioksidant enzim olan süperoksit dismutazın ve katalazın aktivitesinin azaldığı ve lipid peroksidasyon ile sonuçlandığı ve eritrositlerde glutatyon (GSH) seviyesinde düşmeye sebep olduğu gösterilmiştir (Kale ve ark., 1999). Birçok maddenin serbest radikal oluşturarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşması (ROT) ya da hücre içi antioksidant savunma mekanizmalar arasındaki uyumsuzluk ya da hücrenin oksidatif hasarı onarma yeteneğinin kaybı sonucunda hücrelerde oksidatif hasar oluşabilmektedir. Ksenobiyotikler arasında önemli bir grubu oluşturan pestisitlerin neden olduğu toksik etkilerin ortaya çıkarılmasında serbest radikal oluşumunun önemli rol oynadığı bilinmektedir (Mercan, 2004). Deltametrin intoksikasyonun serbest radikal oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir (Manna ve ark., 2005).

Verimeddi (2004) tarafından yapılan çalışmada fare dalak hücreleri permetrin ve endosulfana tek başına ve kombinasyon halinde maruz bırakılmıştır. Söz konusu çalışmada piretroid insektisitlerin tek başlarına verildikleri gruplarda  $H_2O_2$  ve  $O^{2-}$  seviyelerinde artış meydana getirdiği tespit edilmiştir. Permetrin ve endosulfanı kombinasyon halinde verdiklerinde (25  $\mu M$  endosulfan + 50  $\mu M$  permethrin) ise sadece 25  $\mu M$  dozunda endosulfan verilen gruba göre belirgin bir değişikliğin olmadığı ancak permetrinin (50 veya 100  $\mu M$ ) ve endosulfan'ın (150  $\mu M$ ) birlikte uygulandığı gruplarda belirgin bir  $O^{2-}$  üretiminin arttığı belirtilmektedir. Buna rağmen yüksek dozda permetrin (150  $\mu M$ ) ve ek olarak endosulfan verilen (50 ve ya 150  $\mu M$ ) gruplarda  $O^{2-}$  üretiminde belirgin bir değişikliğin meydana gelmediği, bu durumun ise daha farklı sayıda pestisit ilavesinin sonucu değiştirmeyeceğine kanaat getirilmiştir.

Sunulan çalışmada, deltametrine maruz bırakılan primer karaciğer hücre kültüründe oluşması beklenen oksidatif stresin belirtisi olarak en sık üzerinde çalışma yapılan antioksidant enzimler olan SOD1, SOD2 ve GPx 1'in doz ve zamana bağlı ekspresyonları immunositokimyasal olarak incelendi. Organizmada doğal olarak şekillenen, ancak oldukça zararlı serbest radikallerin moleküler oksijene ve hidrojen peroksite dönüşmesine neden olan süperoksit dismutaz 1 enzimi için doz veya zaman bağımlı bir ilişki kurulamamıştır. Erken dönem ve düşük dozda yüksek ekspresyon olduğu gözlemlenmiştir (24. Saat 1  $\mu M$ ) ( $P \leq 0,05$ ). 48. saat bulgularında ise doz artışıyla birlikte SOD 1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Genel olarak grup içinde en düşük ekspresyon seviyelerinin 72. saatte şekillendiği saptanmıştır.

SOD 2 enzim seviyelerinin SOD 1 ile uyumlu olduğu ve en yüksek ekspresyonun 24. saatte ve 1 µM dozda gerçekleştiği gözlenmiştir (%12,36). Diğer tüm dozlarda (10 µM, 100 µM, DMSO, kontrol) 48. saat verilerinin 24. ve 72. saat verilerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol gruplarının ekspresyon seviyelerinin DMSO 'den yüksek olması dikkati çekici bulgulardır.

GPx 1 ekspresyonunda ise 48. saat verilerinde belirgin bir artış olduğu belirlendi. 24. Saat, 1 µM ve 72. saat kontrol grubu boyanma oranları haricinde en yüksek pozitif boyanma oranlarının 48. Saatte gerçekleştiği belirlendi. 24. Saat verilerinde doz artışıyla birlikte GPx1 ekspresyonunda artış gözlenmekle birlikte 48. Saatte tam tersi bir durumun meydana geldiği, doz artışı ile birlikte enzimin ekspresyonunda artış gözlemlendiği tespit edildi. Yine kontrol grupları ile DMSO uygulanan gruplar karşılaştırıldıklarında DMSO grubu verilerinin daha düşük olduğu gözlemlendi.

Çalışmada yer alan antioksidant enzimlerin ekspresyon miktarları birlikte değerlendirildiğinde SOD 1 için 24. saat seviyelerinin; SOD 2 ve GPx 1 verileri için ise 48. Saat oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Gerçek zamanlı PZR ile elde edilen verilerde SOD 1 için 24. saat verileri arasında immunositokimyasal bulgular ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak SOD1 için yapılan immunositokimyasal analizlerde 48. saat verilerinin 72. saat verilerinden daha yüksek olmasına rağmen, PZR analizleri 72. saat verilerinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Yine GPx 1 immunopozitifliği 48. saatte en yüksek seviyede iken, PZR analizlerinde 24. saat bulgularının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bakımdan immunositokimyasal veriler ile PZR analiz sonuçlarının 48. saat ve 72. saat gruplarında birbiriyle uyuşmadığı tespit edilmiştir.

Carolina ve ark., (2011) çalışmasında hücre içi kristal oluşumunu önlediği için hücre kültürlerinin dondurulması aşamasında yoğun şekilde kullanılan DMSO'nun iki önemli etkisinden bahsetmişlerdir. Karbonil oluşumu vasıtasıyla lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile ilişkili hidroksil ve hidroperoksil radikallerin biyolojik sistemlerden uzaklaştırılmasında rol oynadığını belirtmektedirler. Ayrıca DMSO pro-oksidadant özellikte olmasına rağmen, oksidasyon için sülfidril grupları ile reaksiyona girmektedir. Bu önemli bir durumdur, çünkü serbest tiyol grupları sıklıkla proteinlerin yapısında bulunur ve protein fonksiyonunda görev alırlar. Sunulan çalışma kapsamında her saat grubu kendi içerisinde incelendiğinde SOD 1 72. saat grubu haricinde, DMSO

gruplarının en düşük oranda pozitif boyanma gösterdikleri saptanmıştır. Bu bakımdan DMSO'nun hücre kültürlerinin dondurulması sırasında hücre içi kristal oluşumunu engellemesi ve hücrenin patlamasına engel olması gibi etkileri yanında hücrede oluşacak oksidatif stres etkisinin de azaltılması bakımından önemli bir kryoprotektan olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Frances ve ark., (2007)' de yaptıkları çalışmada hücre kültürlerinin elde edilmesinde kullanılan hücrelerin izolasyon aşamasında (tekrarlayan santrifüj aşamaları ve mekanik manipulasyonlar) ve ekimleri aşamasında zarar gördüklerini ve son olarak da karaciğer hayvandan çıkarıldığı aşamada oluşan anoksik fazda hücrelerin hasar gördüklerini belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmada hücre ekiminin yapıldığı aşamadan sonraki ilk 24 saat içerisinde meydana gelen oksidatif olaylar incelenmiştir. Çalışma sonucunda simülasyonla yapılan cerrahi girişim sonucunda alınan karaciğerden kollejenaz perfüzyon yöntemi ile izole edilen hücrelerin bulunduğu vasat içinde reaktif oksijen türlerinin ilk 18 saat içerisinde arttığı daha sonraki saatlerde ise azalmaya başladığı bildirilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin azalması ile antioksidant enzimler olan SOD ve GPx artışının meydana geldiği belirtilmiştir. Bu durumun nedeni olarak izole edilen hepatositlerin ekim öncesi aşamalardan etkilenmesi ve oluşan reaktif oksijen türlerine karşı ancak 18. saatten sonra reaksiyon vermeye başladığı, sonuç olarak ortamdaki ROT'ların hücreler tarafından antioksidant enzimlerle başlatılan reaksiyonlar sonucunda elimine edilmesi olarak görülmüştür. Yani çevre şartlarına adapte olabilmek için hücrelerin zamana ihtiyacı olduğu belirtilmektedir. Sunulan çalışmada oksidatif stresle ilişkili olarak incelenen enzimlerden SOD 1 haricinde diğer gruplarda 48 saat verilerin daha yüksek olduğunun tespit edilmesi Frances ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmayla uyum göstermektedir. Serbest radikal oluşumu sonrasında hücre tarafından üretilen antioksidant enzimler tarafından hücre koruma altına alınabildiği gibi, açığa çıkan serbest oksijen radikalleri hücreyi nekroza ya da apoptoza götürebilmektedir.

Deltametrinin mitokondriyal membran geçirgenliğini uyardığı sıçan beyinde sitokrom c'nin ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu belirtilmektedir (Chen ve ark., 2007). Ayrıca Wu ve arkadaşları (2003) tarafından deltametrinin kültüre edilmiş serebral kortikal nöronlarda ve sıçan beyinde apoptozisi uyardığı göstermişlerdir. Testiküler apoptozisinde deltametrin tarafından uyarıldığı belirtilmiştir. Piretroit

metabolizmasında temel rol oynayan karaciğer hücre kültürü üzerinde deltametrinin apoptotik süreçte rol oynayan mekanizmaları üzerine yapılmış literatür çalışmalarına rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalar genellikle piretiroid maruziyeti ile nörodejenerasyon arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması üzerinde yoğunlaşmıştır (Bloomquist ve ark., 2002).

Hossain ve Richardson (2011) tarafından yapılan hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar deltametrinin apoptotik etkilerinin açığa çıkarıldığı ancak deltametrin tarafından başlatılan bu süreçte yer alan mekanizmaların anlaşılmasına yönelik olarak SK-N-AS nöroblastoma hücrelerini 10 nM-5 µM dozunda ve 24-48 saat inkübe edildiği belirtilmektedir. Deltametrin maruziyetinin doz ve zamana bağlı olarak caspase 3 aktivitesinde ılımlı bir artış görüldüğü bildirilmektedir. 24 saatte 5 µM dozunda deltametrine maruz kalan gruplarda %17 oranında caspase 3 aktivitesinde artış gözlemlendiği, 48. saatte 1 µM ve 5 µM dozlarında ise sırasıyla %21 ve %26 seviyelerinde ılımlı bir artış gözlemlendiği belirtilmektedir.

Wu ve ark., (2003) sinyal üretim seviyesinde deltametrine maruz kalan sıçan astrositlerinin yaşam oranlarının düştüğünü ve intraselüler serbest  $Ca^{+2}$  seviyesinin arttığını, Li ve ark., (2002)  $Ca^{+2}$  seviyesindeki bu artışın sıçan nöronlarındaki apoptozisi arttırdığını belirtmişlerdir. Permetrinle yapılan *in vitro* maruziyet sonucunda dalak hücrelerinin proliferasyonun 25 µM dozda %72 oranında, 100 µM dozda %86 azalttığı bildirilmiştir (Prater ve ark., 2002). Wu ve ark., (2003) yapmış oldukları çalışmada deltametrine maruz bırakılmış kültüre edilmiş kortikal nöronlardaki apoptotik hücre ölümünü araştırmışlardır. Araştırmacılar tarafından 7 gün boyunca kültüre edilmiş nöronlar 10, 100 ve 1000 nM dozda deltametrine maruz bırakılmışlar. 100 ve 1000 nM dozlarda doz ve zamanla orantılı olarak nöronların yaşam güçlerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca TUNEL boyamada 24, 48, 72. saatlerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 100 nM dozda çok sayıda apoptotik hücrenin görüldüğünü, apoptotik hücre sayılarının zamanla ilişkili olarak arttığını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar bu çalışmada deltametrinin nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan NG-nitro-L-arginin sentezini uyararak nöronal apoptozise engel olduğunu, ve bunu p53, Bax ve Bcl-2 gibi genlerin ekspresyonlarında değişiklik oluşturarak yaptığını göstermişlerdir.

Liu ve ark., (2015) deltametrinin Madine Darby Canine Kidney (MDCK, köpek renal tubul hücreleri) hücre kültüründe serbest  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, yaşama gücü ve

apoptozis üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarında, 10 µM ve 40 µM konsantrasyonda deltametrinin dozla ilişkili olarak serbest Ca<sup>2+</sup> seviyesini artırdığını ve 30-60 µM konsantrasyonda dozla paralel olarak hücreleri öldürdüğünü saptamışlardır.

Literatür verilerinde daha çok merkezi sinir sistemi hücreleri ve genital sistem üzerinde yoğunlaşmış çalışmalar mevcuttur. Ancak piretroit mekanizmasında temel rol oynayan karaciğer epitel hücreleri ve bunlardan elde edilen hücre kültürleri üzerinde deltametrinin neden olduğu muhtemel mekanizmaların incelendiği araştırmalara rastlanmamıştır. Literatürlerde genel olarak deltametrine veya diğer piretroitlere maruz bırakılan hücre kültürlerinde doz ve zamana bağlı olarak paralel şekilde caspase 3 ve caspase 9 aktivitelerinde artış gözlenmektedir. Sunulan çalışmada apoptotik mekanizmaların çeşitli aşamalarında rol oynayan caspase 3, caspase 8 ve caspase 9 moleküllerinin belirlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Dış uyarımlı ve iç uyarımlı yolların her ikisinde de son aşamasında, yani apoptozisin son yolağı ölüm fazıdır. Apoptozisin bu aşamasını başlatan, infaz kaspazlarının aktivasyonudur. Ölüm kaspazları nüklear materyali parçalayan endonükleazlarla, çekirdek ve hücre iskelet proteinlerini parçalayan proteazları aktive etmektedirler (Kumar ve ark., 2014). Caspase 3'de nöronlarda ve nöron haricinde diğer hücrelerde apoptozisin ölüm fazında önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Cohen, 1997).

Pestisit maruziyetine bağlı gelişen apoptotik mekanizmanın infaz fazındaki caspase 3 aktivasyonunun bu süreç için kritik bir safha olduğu belirtilmektedir (Choi ve ark., 2010). Literatürlerde detaylı olarak çalışılmamış olmakla birlikte Das ve ark., (2008) yaptığı bir çalışmada deltametrinin HepG2 hücrelerinde caspase 3 aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise deltametrinin 1, 10, 100 µM dozlarında caspase 3 aktivitesinin kontrol gruplarına göre fazla olduğu ancak gruplar ve uygulama saatleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde doz ve zamanla uyumlu veriler elde edilememiştir.

Caspase 8 birçok mekanizmayla aktive olmaktadır ve apoptotik mekanizmanın dış uyarım yoluyla başlamasında ve bu sürecin mitokondriyal yolla sonuçlanmasında rol almaktadır (Zhao ve ark., 2010). Bu çalışmada deltametrine maruz kalmış gruplarda en yüksek oranda ekspresyona 24. saatte rastlanıldığı, ancak 24. saatte deltametrin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte caspase 8 aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Yine 72. saatte de dozla birlikte ters orantılı şekilde caspase 8 aktivitesinin azaldığı

gözlenmektedir. 48. saat bulguları dozla paralellik göstermekte ve literatür bilgileriyle uyum sağlamaktadır. Genel olarak doz ve zaman bakımından gruplar birlikte değerlendirildiğinde caspase 8 tarafından dış uyarımlı apoptotik sürecin 24. saatte ve özellikle 1 µM dozunda yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak da doz ve saatler karşılaştırıldığında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ( $P \leq 0,05$ ) (One-Way Anova, Duncan Testi). Deltametrine maruz kalan gruplarda caspase 8 ekspresyonu hakkında doz ve zamana bağlı olarak literatür verileriyle anlamlı bir ilişki kurulamamasına rağmen kontrol gruplarıyla dozlama yapılan gruplar karşılaştırıldığında deltametrinin apoptotik mekanizmayı dış uyarımlı yolla da aktive ettiği anlaşılmıştır.

Caspase 9, apoptotik süreçte caspase 3'ün ayrılması ve aktive olmasını sağlayarak DNA'nın parçalanmasına yol açan hücre içi sistin proteazlarından biridir (Cohen, 1997; Kitazawa ve ark., 2003). Hossain ve Richardson (2011) caspase 9'un deltametrin tarafından insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve 24 ve 48 saat süreyle deltametrine maruz kalan hücrelerde zaman ve dozla orantılı şekilde caspase 9 aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Sunulan bu çalışmada primer karaciğer hücrelerinde caspase 9 aktivitesinin en yüksek seviyede 24. saat ve 1 µM dozunda olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışma grupları arasında doz ve zamana bağlı olarak caspase 9 ekspresyon oranları arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. DMSO ve kontrol grupları arasında yapılan incelemede 24. saat verilerinde her iki grubun birbirine yakın veriler sunduğu, 48. ve 72. saattlerde ise DMSO grubunda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında caspase 9 aktivitesinde azalma tespit edilmiştir.

Banic ve ark., (2011) primer hepatositlerin izolasyonu aşamasında caspase 9'un preapoptotik hücre stres yanıtı denen tarzda hücre çekirdeğine doğru hareket ettiğini belirtmektedirler. Hücre kültürüne DMSO uygulanmasının caspase 9'un çekirdeğe hareket etmesini engellemediği, ancak izolasyondan hemen sonra primer hepatositlere DMSO uygulanmasının caspase 9'un tam tersi olarak çekirdekten sitosol içerisine hareket etmesini sağladığı belirtilmektedir. Sonuç olarak hücrelerin DMSO ile muamele edilmesi sonucunda caspase 9 yoluyla apoptotik mekanizmanın aktive olmasının geciktirildiği ve DMSO uygulanan hepatositlerin bu sayede yaşam gücü ve sürelerinin daha yüksek olduğu ifade edilmektedir.

Sunulan çalışmada TUNEL reaksiyonu ile caspase 9 ekspresyonu açısından DMSO ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmiştir. Hem TUNEL



metodu sonuçlarında hem de caspase 9 ekspresyonlarında 48. saat ve 72. saat verilerinin birbirlerine paralel olarak kontrol gruplarından düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun caspase 9 üzerinde DMSO'nun iç uyaranlı apoptotik yolu baskıladığı bilgilerini de desteklemektedir. TUNEL metodu ile yapılan incelemede diğer caspase serileriyle uyumlu olarak 24. saat 1 µM dozda en yüksek boyanma oranına rastlanmış, saatler arasındaki ilişki incelendiğinde ise en yüksek TUNEL reaksiyonunun 24. saatte gözlemlendiği, 72. saate doğru bu oranın düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum verilen literatür bilgileriyle uyumlu bulunmuş ancak gruplar içerisinde dozla ilişkili olarak boyanma yoğunlukları arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

Hossain ve Richardson (2011) çalışmalarında elde ettikleri verilerle deltametrinin apoptozisi endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak da uyardığını göstermişlerdir. Klasik olarak bilinen dışsal ve içsel yollarla uyarılan apoptotik mekanizmalarda olduğu gibi, endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak da apoptotik süreç başlayabilmektedir (Verkhatsky, 2005). Endoplazmik retikulum  $Ca^{2+}$  depolanmasından ve  $Ca^{2+}$  homeostazisinde içsel bir rol oynar ve endoplazmik retikulumdaki kalsiyum depolarından kalsiyumun salınması caspase 12'nin aktive olmasını ve sonuçta caspase 3 ve caspase 9'u aktive olmasıyla birlikte apoptozisin gerçekleşmesine neden olan süreçler başlatılmış olur. Deltametrine maruz kalan nöroblastoma hücrelerinde caspase 12 aktivasyonunda doz bağımlı ilişkisi ortaya konulmuştur (Hossain ve Richardson, 2011). Deltametrinin neden olduğu apoptotik mekanizmalarda içsel yolda etkili olan caspase 3, caspase 9 ve dış uyarımlı yolda etkili olan caspase 8'in etkili olduğu sunulan bu çalışmada ortaya konulmakla birlikte, endoplazmik retikulum stresi nedeniyle bir başka yol üzerinden de apoptotik mekanizmanın aktive olup olmadığı belirlenmemiştir. Bu mekanizmalar üzerinde yeterli literatür çalışmasının olmadığı göz önüne alındığında, söz konusu deltametrin ve diğer piretroit toksikasyonlarında gerçekleşen hücre ölümlerinde diğer apoptotik mekanizmalar üzerinde daha fazla sayıda araştırma yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Sunulan çalışmada 20x objektif altında birim alana düşen hepatosit sayıları belirlenmiştir. 48. saatteki hücre sayısının 24. Saate göre daha fazla olduğu; 72. saatte birim alana düşen hücre sayılarının ise azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca gruplara uygulanan deltametrinin dozları arasında yapılan sayımlara göre 1 µM dozdan 100 µM doza doğru gittikçe azalan hücre yoğunluğunun olması Wu ve ark., (2003) sunduğu

verilerle uyumluluk göstermektedir. Literatür verilerine deltametrinin hücre canlılığını artırdığına ve hücre proliferasyonunu uyardığına dair bilgiye rastlanılmamıştır. Tüm uygulama saatlerinde 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M dozlarındaki hücre sayılarının genel olarak DMSO ve kontrol gruplarından daha yüksek hücre yoğunluğuna sahip olduğu anlaşılmakla birlikte hücre yoğunluklarına ilişkin bu verilere yönelik açıklama getirilememektedir.

Sunulan çalışmada oksidatif stres belirteçleri SOD 1, SOD 2 ve GPx 1 aktiviteleri ile caspase 3, caspase 8 ve caspase 9 aktiviteleri ile gruplar arasında bir uyum olduğu gözlenmektedir. Deltametrin toksikasyonunda muhtemelen meydana gelen oksidatif stresin 24. saatte yüksek olduğu ve buna bağlı olarak apoptotik sürecinde 24. saatte yüksek olması arasında bir korelasyon bulundu. Bu durumun muhtemelen Primer karaciğer hücre kültürünün eldesi aşamasında uygulanan prosedür gereği olduğu düşünülmektedir. Zira normal kan dolaşımı ile beslenen ve oksijenlenen hepatositler, perfüzyon ve enzimatik ayırma işlemleri sırasında en az 1 saat boyunca dış ortamda tutulmakta ve bu da hücreleri belirgin bir strese sokmaktadır. Ayrıca Rauckman (1987) yetişkin sıçan hepatositlerinden elde edilen primer hücre kültürlerinin metabolizma ve toksisite çalışmaları için ideal model olarak görüldüğünü belirtmektedir. Ancak söz konusu yetişkin sıçanlardan elde edilen primer karaciğer hücrelerindeki temel sorun, yaşam sürelerinin 7-10 gün gibi kısa olması ve kültür içinde geçirdikleri zamanın artmasıyla birlikte enzimatik aktivitelerinde hızlı bir düşüş meydana gelmesine bağlanmaktadır. Bu nedenle hücre kültürü üzerinde birkaç gün boyunca sürecek toksisite çalışmalarında metabolik olarak dejenere olmuş hücre sistemleri üzerinde yapılan çalışmalarda çelişki sonuçların elde edilebileceğini bildirmiştir (Bonney, 1974; Laishes ve Williams, 1976).

Sunulan çalışma sonucunda gerek apoptotik mekanizmaların açığa çıkarılması amacıyla ekspresyonlarına bakılan caspase 3, caspase 8 ve caspase 9 ile TUNEL reaksiyonları, gerekse oksidatif streste rol oynayan SOD1, SOD2 ve GPx 1 enzimlerin ekspresyonları birlikte değerlendirildiğinde; deltametrine maruz kalmış hepatositlerin metabolik ve enzimatik olarak 24. ve 48. saatlerde daha aktif oldukları yorumu yapılabilir. Söz konusu tablo PZR bulgularıyla da uyumlu olup, 72. saate ait oksidatif streste rol oynadığı bilinen SOD 1, SOD 2 ve GPx 1 miktarlarına ait ölçüm yapılamamıştır. Bu durumla ilgili olarak Hossain ve Richardson (2011) tarafından yapılan bir çalışmada deltametrinin yüksek dozlarına (10  $\mu$ M ve üstü) 48 saatte süreyle

maruz kalan SK-N-AS dopaminerjik hücrelerde açık şekilde hücre ölümünün tetiklendiği, deltametrinin daha düşük konsantrasyonların da (100 nM-5 µM) ve 24. saatte ise diğer literatür verileri ile uyumlu olarak DNA fragmentasyonu ve apoptozisin tüm özellikleri gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında 24. saatte meydana gelmiş olan yüksek orandaki ekspresyonların, hücrelerin kültürlerinin elde edilme aşamasında, meydana gelen dış koşullardaki değişikliklerin erken oksidatif stresi ve süreç sonunda da apoptotik mekanizmaların uyarılmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Doz ilişkili olarak ekspresyon miktarlarındaki anlamlı artışlar genellikle 48. saat verilerinde görülmüş, bunun nedeninin hücrelerin erken oluşan stres etkilerinden kurtulup daha anlamlı verileri bu saatten sonra vermesine bağlanmıştır. Hücre kültürlerinde 72. saat verilerinin en düşük seviyede olması; hücrelerin yaşam gücü ve sürelerinin zamanla azalması ve buna paralel olarak enzimatik aktivite ve metabolizmalarının yavaşlaması ile açıklanabilir.

Dornetshuber ve ark., (2008) yaptığı çalışmada permetrinin insan hepatoma hücreleri (HCC-1.2) ve primer karaciğer hücreleri üzerindeki biyolojik etkileri ve apoptozisin uyarılmasının incelenmesi amacıyla, permetrin 2 µM ve 50 µM arasında konsantrasyonlarda dozlama yapılmıştır. Sunulan çalışma ve Dornetshuber ve ark., (2008)'e ait sonuçlara göre, primer karaciğer hücre kültürleri üzerinde metabolik ya da enzimatik aktivitelerin ölçülmesine yönelik yapılacak çalışmalarda, uygulanacak dozlamalar arasındaki farkın daha düşük seviyede tutulması gerektiği (100 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM ve 50 µM gibi) ve analiz zamanlarının daha sık tutulması gerektiği (12. Saat, 18. Saat, 24. Saat, 30. Saat) kanaatine varılmıştır. Primer karaciğer hücre kültürleri üzerinde deltametrinin etkilerinin incelendiği literatür verisine rastlanmamış olmasına rağmen, diğer hücreler üzerinde yapılan dozlamalarla karşılaştırıldığında özellikle 100 µM deltametrin dozunun bu hücrelerde ani ölümlere neden olduğu düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Genel olarak deltametrin ve diğer piretroit insektisitler üstüne yapılan çalışmaların sinir sistemi ve genital sistem üzerine yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca primer karaciğer hücre kültürü üzerine deltametrinin uyardığı oksidatif ve apoptotik mekanizmaların açığa çıkarılmasına yönelik çalışmalara literatür verilerinde rastlanmamıştır. Bu araştırmada, oldukça yüksek insektisidal aktiviteli ve memeliler için düşük derecede toksik özellik gösteren deltametrinin primer karaciğer hücre kültürü üzerindeki oksidatif ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Organizmada oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin doku ve hücreler üzerindeki zararlı etkilerini ortadan kaldırmada etkili enzimler olan süperoksit dizmutazların (1 ve 2) ve glutatyon peroksidazın aktivitelerin deltametrin uygulamasına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Ancak uygulama saatleri (24, 48, 72) ve uygulama dozları (1 µM, 10 µM, 100 µM, DMSO, Kontrol) arasında zaman-doz ilişkisine dayalı anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilememiş, bu enzimler açısından 72. saat grubunda ve kontrol gruplarında düşük oranda ekspresyon gözlenmiştir. DMSO gruplarında kontrol gruplarına oranla genel olarak daha düşük ekspresyon meydana geldiği belirlenmiş olup, önceki literatür bilgileri ile uyumlu olarak hücre kültürlerinin dondurulması ve çözücü olarak sıklıkla DMSO kullanılmasının oksidatif stresi baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Piretroit insektisitler nedeniyle oluşan toksikasyonlarda meydana gelen oksidatif stresin olası bir apoptotik hücre ölümünü tetiklediği düşünülerek, apoptotik süreçte yer caspase 3, caspase 8 ve caspase 9 gibi enzimlerin aktivasyonu ile TUNEL reaksiyonlarının deltametrin tarafından tetiklendiği ortaya konulmuş olup, bu sayede apoptotik mekanizmanın hem iç uyarım hem de dış uyaran yol ile aktive olduğu belirlenmiştir. Apoptotik süreçte yer alan enzimlerin aktivitesi ile oksidatif streste yer alan enzimlerin aktivasyonlarıyla ilişkili olarak paralel veriler elde edilmesine rağmen, apoptotik enzimlerin ekspresyonlarında zaman ve doz ilişkili anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilememiştir. Bazı araştırmacılar deltametrinin başka yollar üzerinden de (endoplazmik retikulum stresi) apoptozisin tetiklendiğini belirtmişlerdir. Tüm bu verilerden elde edilen sonuçlara göre, deltametrin ve metabolik yolda en çok etki gösteren organ olan karaciğer üzerine yapılmış çalışmaların bu mekanizmaların açığa çıkarılması için yeterli olmadığı, başka çalışmalarla da bu bulguların desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yetişkin sıçan hepatositlerinden elde edilen primer kültürler metabolizma ve toksisite çalışmaları için ideal model olarak görülmektedir. Ancak primer karaciğer hücrelerindeki temel sorun yaşam sürelerinin kısa olması ve kültür içerisinde zaman bağlı olarak enzimatik aktivitelerinde hızlı bir düşüş meydana gelmesidir. Bu nedenle hücre kültürü üzerinde birkaç gün boyunca sürecek toksisite çalışmalarında metabolik olarak dejenere olmuş hücre sistemlerinde yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilebileceği unutulmamalıdır. Primer karaciğer hücre kültürleri üzerinde metabolik ya da enzimatik aktivitelerin ölçülmesine yönelik yapılacak çalışmalarda, uygulanacak dozlar arasındaki farkın daha düşük seviyede tutularak analiz zamanlarının daha sık yapılması gerektiği (12. Saat, 18. Saat, 24. Saat, 30. Saat) kanaatine varılmıştır.

Sunulan çalışma sonucunda, tarım ve veteriner hekimliğinde yaygın şekilde kullanılan tip 2 piretroit insektisit olan deltametrinin, *in vitro* karaciğer epitel hücreleri üzerinde oksidatif strese neden olduğu ve çeşitli mekanizmalar aracılığı ile apoptotik süreci uyardığı belirlenmiştir. Deltametrinin kullanım alanının yaygınlığı, doğada yoğun şekilde bulunabilmesi ve canlı organizmada gerçekleştirdiği reaksiyonlar göz önüne alındığında, söz konusu insektisit kullanımının daha dikkatli bir şekilde yapılması ve bu insektisitlerle temasa geçebilecek olan canlıların da bu etkilerden uzak tutulması amacıyla gerekli önlemlerin alınması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abd El-Aziz MI, Sahlab AM, Abd el-Khalik M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wschr.* 1994;101:230–232.
- Aitken RJ, Clarkson J, Fisher S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;40:183–197.
- Aitken RJ, Harkiss DU, Buckingham DE. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1993;35:302–315.
- Akkus İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı. Konya. Mimoza Yayınları. 1995.
- Alberts B. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Science. 2008.
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Fernández-Cruz ML, Díaz MJ, Fernández MC, Martínez MA. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1996;141: 8-16.
- Anonim. [https://www.researchgate.net/figure/23249168\\_fig3\\_Figure-2-Chemical-structure-of-deltamethrin](https://www.researchgate.net/figure/23249168_fig3_Figure-2-Chemical-structure-of-deltamethrin), 2016.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281:1305–1308.
- Banic B, Nipic D, Suput D, Milisav I. DMSO modulates the pathway of apoptosis triggering. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16(2):328-341.
- Barnhart BC, Alappat ECM, Peter E. The CD95 type I/type II model. *Seminars in Immunology.* 2003;15: 185-193.
- Bast GE, Taeschner D, Kampffmeyer HG. Permethrin absorption not detected in single-pass perfused rabbit ear, and absorption with oxidation of 3-phenoxybenzyl alcohol. *Archives of Toxicology.* 1997;71: 179-186.
- Bhabak KP, Mugesh G. "Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants". *Accounts of Chemical Research.* 2010;43(11): 1408–1419.
- Blanco-Rodriguez J, Martínez-García C. Apoptosis precedes detachment of germ cells from the seminiferous epithelium after hormonal suppression by short-term oestradiol treatment of rats. *Int. J. Androl.* 1998;21:109–115.
- Bloomquist JR, Adams PM, Soderlund DM. Inhibition of gamma-aminobutyric acid-stimulated chloride flux in mouse brain vesicles by polychloroalkane and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology.* 1986;7:11–20.
- Bloomquist JR, Barlow RL, Gillette JS, Li W, Kirby ML. Selective effects of insecticides on nigrostriatal dopaminergic nerve pathways. *Neurotoxicology* 2002;23: 537–544.

- Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Muller D, Albertini S, Suter L. Gene Expression in Two Hepatic Cell Lines, Cultured Primary Hepatocytes, and Liver Slices Compared to the in Vivo Liver Gene Expression in Rats: Possible Implications for Toxicogenomics Use of in Vitro Systems. *Toxicological Sciences* 2003;73:386–402.
- Bonney RJ. Adult Liver Parenchymal Cells in Primary Culture: Characteristics and Cell Recognition Standards. *In Vitro*. 1974;10(1):130-142.
- Bradberry SM., Cage SA., Proudfoot AT., Vale JA. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev*. 2005;24: 93 – 106.
- Broockfor FR, Blake CA. Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage to the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities. *Biol. Reprod*. 1997;57: 267–277.
- Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf FI, Palozza P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006;211:87–96.
- Carolina SS, Ramón SO, Inés SS, Estefanía MÁ. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2011;63:209–215.
- Catinot R, Hoellinger H, Sonnier M, Do CT, Pichon J, Nguyen HN. In vitro covalent binding of the pyrethroids cismethrin, cypermethrin and deltamethrin to rat liver homogenate and microsomes. *Arch. Toxicol*. 1989;63:214–220.
- Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull*. 1993; 49(3): 481-493.
- Chen D, Huang X, Liu L, Shi N. Deltamethrin induces mitochondrial membrane permeability and altered expression of cytochrome C in rat brain. *J Appl Toxicol* 2007;27:368-372.
- Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1999;1:5–15.
- Choi WS, Abel G, Klintworth H, Flavell RA, Xia Z. JNK3 mediates paraquat- and rotenone-induced dopaminergic neuron death. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2010;69:511–520.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J*. 1997;326(Pt 1):1–16.
- Committee For Medicinal Products For Veterinary Use Deltamethrin Summary Report 4. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections, London. 2004;2.

- Daniel F, Ronco MT, Elena O, Alvarez ML, Quiroga A, Parody JP, Monti J, Carrillo MC, Carnovale CE. Oxidative stress in primary culture hepatocytes isolated from partially hepatectomized rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2007;85: 1047–1051.
- Das PC, Streit TM, Cao Y, Rose RL, Cherrington N, Ross MK, Wallace AD, Hodgson E. Pyrethroids: cytotoxicity and induction of CYP isoforms in human hepatocytes. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2008;23:211–236.
- Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clin. Tech. Equine Pract.* 2003;2(3):278-291.
- de la Torre FR, Ferrari L, and Salibián A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp. Biochem. Phys. C.* 2002; 131(3): 271-280.
- Doi H, Kikuchi H, Murai H, ve ark. Motor neuron disorder simulating ALS induced by chronic inhalation of pyrethroid insecticides. *Neurology.* 2006;67(10): 1894–1895.
- Dornetshuber J, Bicker W, Lämmerhofer M, Lindner W, Karwan A, Bursch W. Impact of stereochemistry on biological effects of permethrin: induction of apoptosis in human hepatoma cells (HCC-1.2) and primary rat hepatocyte cultures. Department of Medicine I, Institute of Cancer Research, Research Unit Toxicology and Prevention, Medical University of Vienna. 2008.
- Edwards M, Houseman L, Phillips IR ve diğerleri. Isolation of mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol.* 2013; 987:283–293.
- El-Gohary M, Awara WM, Nassar S, Hawas S. Deltamethrin induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology.* 1999;132:1-8.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
- Emara AM, Draz EI. Immunotoxicological study of one of the most common over-the-counter pyrethroid insecticide products in Egypt. *Inhal. Toxic.* 2007;19(12):997-1009.
- Farag AT, Goda NF, Shaaban NA, Mansee AH. Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reprod. Toxicol.* 2007;23:560–567.
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Beşinci Baskı, 2005; 386-388.
- Fridovich, I. Oxidative Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group. 2001;1-5.



- Gamain B, Arnaud J, Favier A, Camus D, Dive D, Slomianny C. Increase in glutathione peroxidase activity in malaria parasite after selenium supplementation. *Free Radical Biol. Med.* 1996;21:559–565.
- Gebhardt R. Special issue on: international congress on hepatocytes: applications in cell biology, toxicology and medicine. *Cell. Biol. Toxicol.* 1996:1-65.
- Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30:1019–1030.
- Guilhermino L, Lacerda M, Nogueira A, and Soares A. In vitro and in vivo inhibition of daphnia magna acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci. Total. Environ.* 2000; 247: 137-141.
- Guillouzo A. Liver Cell Models in in Vitro Toxicology. *Environmental Health Perspectives.* 1998;106:511-532.
- Gupta RC. *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles.* Academic Press, California. 1. Basim. 2007; 496.
- Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301:5–17.
- Haddad JJ. Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor- $\kappa$  B. *Critical Care.* 2002;6:481-490.
- Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group. 2001; 1-7.
- Haug G, Hoffman H. *Chemistry of Plant Protection 4: Synthetic Pyrethroid Insecticides: Structures and Properties.* Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1990.
- Hawazen AL. Effect of silymarin against deltamethrin induced histological and biochemical changes in liver of albino rats. *Journal of American Science.* 2011;7(6):1-11.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 2002;133:537–556.
- Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993;75: 241-251.
- Hoek JB, Rydström J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochemical Journal.* 1988;254: 1-10.
- Hossain, M.M., Suzuki, T., Sato, I., Takewaki, T., Suzuki, K., Kobayashi, H. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. *NeuroToxicology.* 2004; 25, 825–833.
- Hossain MM, Richardson JR. Mechanism of Pyrethroid Pesticide–Induced Apoptosis: Role of Calpain and the ER Stress Pathway. *Toxicol Sci.* 2011;122(2):512–525.

- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995;81:495–504.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:277–288.
- Jin Y, Zheng S, Pu Y, Shu L, Sun L, Liu W, Fu Z. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2011;82:398-404.
- Kale M, Rathore N, John S, Bhatnagar D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: as possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett*. 1999;105:197–205.
- Katsuda Y. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *PesticSci*. 1999;55:775 –782.
- Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2. baskı, MedisanYayın Evi. 2002:385-402.
- Kayış T. Diazinon'un Subletal Konsantrasyonlarının *Pimpla Turionellae* L.'Nin Eşey Oranı Ve Bazı Biyokimyasal Parametreleri Üzerine Etkileri, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2010;16.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-257.
- Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. Acute liver failure: a review. *Clin. Liver Dis*. 2006;10: 239–258.
- Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Dieldrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase C delta in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration. *Neuroscience*. 2003;119:945–964.
- Krief A, Jeanmart S, Kremer A. Reprint of “Inspired by flowers: synthetic routes to scalemic deltamethrinic acid”. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:4106-4126.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. 2009; 16:3-11.
- Kulkarni AP, Hodgson E. Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. *PharmacolTher*. 1980;8:379–475.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Elsevier Saunders, 9. Basım. 2014;52-58.

- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171:4672–4679.
- Laishes BA, Williams GM. Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. *In Vitro.* 1976;12,(7):521-532.
- Last JM, Wallace RB. *Moses, Marine, Pesticides.* In: Maxcy Rosenau Last Public Health and Preventive Medicine. 13. Baski. Prentice Hall mt Co. NewYork. 1992.
- Larson AM. Acute liver failure. *Dis. Mon.* 2008;54:457–485.
- Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 2003; 544:43–64.
- Li T, Shi N, Xu H, Wei H, Wu Y, Zhou L, et al. Effects of deltamethrin on intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration and apoptosis in rat neural cells. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2002;20:427-429.
- Liu FJ , Chou CT, Cheng JS, Chang HT , Liang WZ , Kuo CC, Kuo SY , Kuo DH, Shieh P, Chang FR, Jan CR. Ca<sup>2+</sup> movement and apoptosis induced by deltamethrin in Madine Darby canine kidney canine renal tubular cells. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 2015; 31: 1-8.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104:487–501.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K, Werb Z. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 1996;122:181–193.
- Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Ind. J. Pharmacol.* 2005;37:160-164.
- Maraban E, Yamagishi T, Tomaselli GF. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol.* 1989;508:647–657.
- Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Kroemer G. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol redoxidation on mitochondrial function. *Eur J Immunol.* 1997;27(1):289-296.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta* 1982;126:41–51.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005;22:355–70.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erithrocuprein (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1969;244:6049-6055.

- McCord JM, Fridovich I. "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)". *Free Radic. Biol. Med.* 1998;5 (5-6): 363-369.
- Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg.* 2004;15(1-2),91-96.
- Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurol Res Int.* 2011;1-9.
- Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C. ve ark. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation.* 2004;77:1614-1616.
- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. "Trends in oxidative aging theories". *Free Radic. Biol. Med.* 2007;43(4):477-503.
- Narahashi T. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. *Neurotoxicology.* 1985;6:3-22.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
- Oktay Ö, Üstüner O. Investigations About Genotoxicity of Deltamethrin. *Academic Journal. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2012;18(1):69-74.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death, Apoptosis. 2007;12:913-922.
- Park K, Williams DP, Naisbitt DJ, Kitteringham NR, Pirmohamed M. Investigation of toxic metabolites during drug development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 207:425-434.
- Prater RM, Gogal Jr, Blaylock BL, Longstreth J, Holladay SD. Single-dose topical exposure to the pyrethroid insecticide, permethrin in C57BL/6N mice: effects on thymus and spleen. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40:1863-1873.
- Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Review.* 1987;87:955-979.
- Rauckman EJ. The Isolated Hepatocyte: Use in Toxicology and Xenobiotic Biotransformations, Xenobiotic metabolism and toxicity in postnatal rats 1987; syf 191.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 2001;322:1536-1538.
- Rickard J, Brodie ME. Correlation of blood and brain levels of the neurotoxic pyrethroids deltamethrin with the onset of symptoms in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1985;23;143-146.
- Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. An Attempt to Evaluate the Rate of the Haber-Weiss Reaction by Using OH Radical Scavengers. *FEBS Lett.* 1977; 80:130-132.

- Saber AS, Wael MA. Effect of leave extract of *Ocimum basilicum* on deltamethrin induced nephrotoxicity and oxidative stress in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;02(05):22-27.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96–99.
- Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784–788.
- Sendensky A, Dufour JF. *Liver Physiology, Clinical Gastroenterology: Chronic Liver Failure Mechanisms and Management* Gines, P; Kamath PS; Arrovo, 5. baskı, 2011; 33-45.
- Serafini, M, Del Rio D. Understanding the Association Between Dietary Antioxidants, Redox Status and Disease: Is the Total Antioxidant Capacity the Right Tool?. *Redox Report*. 2004;9(3),145-152.
- Shona SI, El Aasar EM, Zaki SM, Sayed WM. Morphological and morphometric renal changes in the adult albino rat following oral administration of deltamethrin and the possible protective role of vitamin-E. *J.Appl. Sci*. 2010;6(4):280-290.
- Shukla Y, Arora A, Singh A. Tumourigenic studies on deltamethrin in Swiss albino mice. *Toxicology*. 2001;163:1-9.
- Shukla Y, Taneja P. Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay. *Mut.Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2000;467:119-127.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase 3, 6, and 7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:7320–7326.
- Spencer J, O'Malley M. Pyrethroid illnesses in California, 1996 – 2002. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 2006;186:57–72.
- Şanlı Y. Çevre Sorunları ve Besin Kirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, Özel Sayı. 1984;17-37.
- Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rat. *Arch Toxicol*. 2001;75:42–51.
- Tang J, Cao Y, Rose RL, Hodgson E. In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem Biol Interact*. 2002;141:229–241.
- Tang W. Drug metabolite profiling and elucidation of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2007;3:407–420.
- Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1994;34:281–320.

- Teaf CM, Harbison RD, Bishop B. Germ-cell mutagenesis and GSH depression in reproductive tissue of the F-344 rat induced by ethyl methane sulfonate. *Mutat Res.* 1985;144:93–98.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129:2799–2801.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation". *Science* 1984;226(4678):1097–1099.
- U.S. Department Of Health And Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile For Pyrethrins And Pyrethroid. 2003.
- Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, Kenney MC. "SOD1: a candidate gene for keratoconus". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(8): 3345–3351.
- Uysal M. Serbest radikaller, lipit peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim.* 1998;11:336-340.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266:37-56.
- Vemireddi V. Immunotoxic and oxidative effects of endosulfan and permethrin on murine splenocytes, in vitro. Department of Biomedical Sciences and Pathobiology Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine 2004.
- Verkhatsky A. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol. Rev.* 2005;85:201–279.
- Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635–1636.
- Waring JF, Ciurlionis R, Jolly RA, Hein-del M, Gagne G, Fagerland JA, Ulrich, RG. Isolated human hepatocytes in culture display markedly different gene expression patterns depending on attachment status. *Toxicol. InVitro.* 2003; 17: 693–701.
- Whittaker V. The Contribution of drugs and toxins to understanding of cholinergic function. *Trends in Physiological Sciences.* 1990;11: 8–13.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 2003;31:1035–1042.
- Williams PL, James RC, Roberts SM. Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications. Second ed., A Wiley- Interscience Publication, U.S.A. 2000; 345–366.

- Winston GW. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991;100:173–176.
- World Health Organization (WHO). Pesticide Residues in Food 2000 - Deltamethrin; International Programme on Chemical Safety, Food and Agriculture Organization of the United Nations and, Geneva, Switzerland. 2001;79-110.
- Wu A, Li L, Liu Y. Deltamethrin induces apoptotic cell death in cultured cerebral cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;187:50-57.
- Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, Oksidative Stres and Free Radical Damage. *Alcohol Res. Health.* 2003; 27(4):277–284.
- Wu YT, Shi N, Wang SQ, Li T, Chen JH, Zhou L, ve diğerleri. Effects of deltamethrin on cell survival rate and intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration in primary cultured astrocytes of rat. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2003;21:194-196.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation.* 2005;10(115):2656-2664.
- Yoshida M, Kitani T, Takenaka A, Kudoh K, Katsuda SI, Taya K, ve ark. Lack of effects of oxolinic acid on spermatogenesis in young male adult and aged Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 2002;40:1815–1825.
- 
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.". *Free Radic. Biol. Med.* 2003;33(3):337–349.
- Zhao Y, Sui X, Ren H. From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8. *J Cell Physiol.* 2010;225:316-320.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayhan GACAR

Doğum Yeri: Tire/İzmir

Doğum Tarihi: 05.01.1985

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans Mezuniyeti, Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi (2004-2009)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: 2010-2014 OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
2014- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

E-posta: ayhan.gacar@omu.edu.tr

vt\_ayhangacar@hotmail.com



