T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ ve SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS, TANNİK ASİT ve ÇİNKONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevil EROL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

Ekim, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Sevil EROL tarafından, **Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR** danışmanlığında hazırlanan ***"HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ ve SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS, TANNİK ASİT ve ÇİNKONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI"*** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **21/10/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR İSTANBUL Üniversitesi - Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN İSTANBUL Üniversitesi - Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ İSTANBUL Üniversitesi - Cerrahpaşa Fizyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Fatma Ateş Beykent Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Denizhan Karış İstinye Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ ve SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS, TANNİK ASİT ve ÇİNKONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 34836

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca ilerlediğim akademik yolda, daima beni destekleyen, beni yönlendiren, bana ışık tutan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR'e,

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa'da doktora eğitimine adım attığım ilk günden doktora yeterlilik dönemine kadar olan süreçte danışmanım olan, beni daima desteklemiş, yönlendirmiş olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, emekli olması nedeniyle ayrılan, ilk danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ü. Bora BARUTÇU'ya,

Lisansüstü eğitimim boyunca ilerlediğim akademik süreçte, bana katkıda bulunmuş olan İ.Ü. Cerrahpaşa Biyofizik Anabilim Dalı başkanı hocam Prof. Dr. Alev Meltem ERCAN'a ve Biyofizik Anabilim dalındaki tüm hocalarıma,

Tezimin tüm aşamalarında ihtiyaç duyduğum her konuda bana destek olan, tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Bahar Öztürk KURT'a,

Tez çalışmam sırasında gerektiğinde Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarını kullanma imkanı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Bircan DİNÇ'e,

Hayatım boyunca destekleri ile her zaman yanımda olan aileme,

Teşekkürlerimi sunarım…

Ekim 2022 **Sevil EROL**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ii
BEYAN iii
BÜTÇE DESTEKLERİ v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ŞEKİL LİSTESİ x
TABLO LİSTESİ xiiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ xiiiiii
ÖZET xv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ 1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE 3
2.1. Pestisitler……3
2.1.1. Pestisitlerin Tarihçesi……...3
2.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılmaları …….…….4
2.1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Pestisitlerin Kullanımları…….....7
2.1.4. Pestisitlere Doğrudan ve Dolaylı Olarak Maruz Kalma Yolları…….....9
2.1.5. Gıdalardaki Pestisit Kalıntılarının Etkileri ve Pestisitlerin Analiz Edilmesi…….11
2.1.6. Pestisitlerin Toksisitesi……..13
2.2. İnsektisitler……...15
2.3. Organofosfatlı İnsektisitler……..16
2.3.1. Organofosfatlı İnsektisitlerin Özellikleri…….....16
2.3.2. Organofosfatların Toksik Etki Mekanizmaları……..19
2.4. Klorpirifos……...…….23
2.4.1. Klorpirifos'un Kimyasal Yapısı ve Özellikleri……...24
2.4.2. Klorpirifos'un Metabolizması ve Toksik Etki Mekanizmaları….……..25
2.5. Organofosfatlı Pestisitlerin Asetilkolin ve Asetilkolinesteraz Üzerine Etkisi….....27

2.5.1. Klorpirifos'un Sağlık Üzerinde Oluşturduğu Toksik Etkiler…….29
2.6. Çinko…….....30
2.7. Tanenler ve Tannik asit (TA)…….....35
2.7.1. Tannik Asit Yapısı…….37
2.7.2. Tanenler' in Biyolojik Etkileri……38
2.8. Hücre Canlılığı Analizleri……41
2.8.1. MTT Canlılık Analizi……41
2.8.2. xCELLigence Analizi …….....42
3. YÖNTEM 43
3.1. GEREÇLER……..……43
3.1.1. Kimyasallar……..43
3.1.2. Cihazlar…….....44
3.2. YÖNTEMLER…….....46
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması……...46
3.2.2. Hücre Kültürü……..46
3.2.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi……48
3.2.2.2. Hücrelerin Pasaj İşlemi…….……...48
3.2.2.3. Hücrelerin Dondurularak Saklanması……..……49
3.2.2.4. Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi……...49
3.2.3. Hücre Canlılığı Analiz Yöntemleri……..51
3.2.3.1. MTT Analizi Yöntemi ……...51
3.2.3.2. xCELLigence Analizi Yöntemi……..52
3.2.4. İstatiksel Analiz……....54
4. BULGULAR 55
4.1. MTT Hücre Canlılığı Analizi ……55
4.1.1. Klorpirifos'un Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi…….....55
4.1.1.1. 24 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….……55
4.1.1.2. 48 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….56
4.1.1.3. 72 saatlik MTT Analiz Sonuçları.……57
4.1.1.3.1. Klorpirifos'un MTT analizine ait mikroskop görüntüleri……...59
4.1.2. Tannik Asit'in Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi……...60
4.1.2.1. 24 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….60
4.1.2.2. 48 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….61

4.1.2.3. 72 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….62
4.1.2.3.1. Tannik Asit'in MTT analizine ait mikroskop görüntüleri……..64
4.1.3. Çinko Oksit'in (ZnO) Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi…….65
4.1.3.1. 24 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….65
4.1.3.2. 48 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….66
4.1.3.3. 72 saatlik MTT Analiz Sonuçları…….67
4.1.3.3.1. Çinko Oksit'in MTT analizine ait mikroskop görüntüleri……...69
4.2. xCELLigence Analiz Sonuçları……70
4.2.1. Klorpirifos'un xCELLigence Analiz Sonuçları……70
4.2.1.1. 24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...70
4.2.1.2. 48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...70
4.2.1.3. 72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...70
4.2.2. Tannik Asit'in xCELLigence Analiz Sonuçları……71
4.2.2.1. 24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...71
4.2.2.2. 48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...71
4.2.2.3. 72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...72
4.2.3. Çinko Oksit'in xCELLigence Analiz Sonuçları……..72
4.2.3.1. 24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...72
4.2.3.2. 48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...73
4.2.3.3. 72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları……...73
5. TARTIŞMA.....74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....87
KAYNAKLAR.....88
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....105
ETİK KURUL İZİN YAZISI.....106
KURUM İZNİ YAZILARI.....107
ÖZGEÇMİŞ.....108

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. 2017 yılında Türkiye'de illere göre tarım ilacı kullanım oranları [20]……..8

Şeki 2.2. Asetilkolin (ACh) ve Asetilkolinesteraz (AChE) ilişkisi [41]……...20

Şekil 2.3. Klorpirifos'un biyotransformasyon mekanizması [11]……26

Şekil 2.4. Klorpirifos'un metabolizması [49]……...27

Şekil 2.5. Organofosfatlı pestisitlerin Asetilkolinesteraz üzerine etkisi [11]……...28

Şekil 2.6. Çinko taşıyıcı ZnT 1-4 ailesinin öngörülen konumları ve doku özgünlükleri [58]……...34

Şekil 2.7. Kondanse tanenlerin molekül yapısı [58]…….37

Şekil 2.8. Tannik asit yapısı [68]……..38

Şekil 2.9. Tanenlerin antioksidan ve prooksidan özellikleri [85]…….....40

Şekil 3.1. Hassas Terazi (a), Soğutmalı Santrifüj Cihazı (b) ve Su Banyosu (c)……45

Şekil 3.2. xCELLigence Cihazı (a) ve Ölçüm Aşaması (b)……..45

Şekil 3.3. CO_2 İnkübatörü (a) ve İnkübe edilen hücreler (b)……46

Şekil 3.4. HEK293 hücreleri [13]…….47

Şekil 3.5. Laminar Akım Kabini……...47

Şekil 3.6. Thoma lamı [108]…….50

Şekil 3.7. Canlı ve ölü hücrelerin mikroskobik görüntüsü [109]…….51

Şekil 4.1. Klorpirifos'a (KP) ait 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……..56

Şekil 4.2. Klorpirifos'a (KP) ait 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……..57

Şekil 4.3. Klorpirifos'a (KP) ait 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……..58

Şekil 4.4. Klorpirifos dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği……58

Şekil 4.5. Kontrol (A), 10 µg/mL (B), 30 µg/mL (C), 60 µg/mL (D), 90 µg/mL (E) Klorpirifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri ……...59

Şekil 4.6. Tannik asitin 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……61

Şekil 4.7. Tannik asitin 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……62

Şekil 4.8. Tannik asitin 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği……63

Şekil 4.9. Tannik asit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği ……...63

Şekil 4.10. Kontrol (A), 5 µM (B), 10 µM (C), 15 µM (D), 20 µM (E), 25 µM (F) Tannik asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri……..64

Şekil 4.11. Çinko Oksit'in (ZnO) 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği…….....66

Şekil 4.12. Çinko Oksit'in (ZnO) 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği…….....67

Şekil 4.13. Çinko Oksit'in (ZnO) 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği…….....68

Şekil 4.14. Çinko Oksit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği ……...68

Şekil 4.15. Kontrol (A), 25 µM (B), 50 µM (C), 75 µM (D), 100 µM (E), 150 µM (F) Çinko Oksite'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri…….69

Şekil 4.16. Değişen konsantrasyonlarda Klorpirifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri……..70

Şekil 4.17. Değişen konsantrasyonlarda Tannik Asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri……..71

Şekil 4.18. Değişen konsantrasyonlarda Çinko Oksit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri …….....72

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Pestisitlerin akut toksisite bakımından sınıflandırılması (Sıçanlarda LD_{50} mg/kg) [10]……14

Tablo 2.2. Organofosfatlı insektisitlerin genel yapıları [2, 11]……16

Tablo 2.3. Organofosfatlı bileşiklerin toksisite yönünden risk sınıflandırması örnekleri [11, 13]……..18

Tablo 2.4. Klorpirifos'un ve Klorpirifos-okson'un kimyasal yapıları [42]…….25

Tablo 4.1. Klorpirifos'un (KP) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……56

Tablo 4.2. Klorpirifos'un (KP) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……57

Tablo 4.3. Klorpirifos'un (KP) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……58

Tablo 4.4. Tannik Asit'in (TA) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……60

Tablo 4.5. Tannik Asit'in (TA) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……61

Tablo 4.6. Tannik Asit'in (TA) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……62

Tablo 4.7. Çinko Oksit'in (ZnO) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……65

Tablo 4.8. Çinko Oksit'in (ZnO) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……66

Tablo 4.9. Çinko Oksit'in (ZnO) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)……67

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATCC	: American Type Culture Collection
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BHC	: Benzenhekzaklorür
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
CarbE	: Karboksil esteraz
CAT	: Katalaz
ChE	: Kolinesteraz
CYP450	: Sitokrom P450
CPF	: Klorpirifos
CPO	: Klorpirifos-okson
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroethan
DEP	: Dietilfosfat
DEPT	: Dietiltiyofosfat
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit (Dimetyhl Sulfoxide)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Gıda ve İlaç Yönetimi
GC-MS	: Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
GSH	: Glutatyon
GSSH	: Oksitlenmiş glutatyon
GST	: Glutatyon-S- transferaz

GGT : γ-Glutamil transferaz

GSH-Px : Glutatyon Peroksidaz

HCH : Hekzaklorosiklohekzan

HEK 293 : Human Embriyonic Kidney Cells (İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi)

IC50 : Hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon

KP : Klorpirifos

LC_{50} : % 50 Öldürücü Konsantrasyon

LD_{50} : % 50 Öldürücü Doz

LDH : Laktat Dehidrogenaz

MTT : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid

MRL : Maksimum Kalıntı Limitleri

NHL : Non-Hodgkin Lenfomu

PBS : Phosphate Buffered Saline

PChE : Pseudokolinesterazlar

PON-1 : Paraoksonaz-1

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

RSHMB-ZAM :Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Zehir Araştırmaları Müdürlüğü

RTCA DP : Gerçek zamanlı hücre analizi (Real Time Cell Analysis System)

TA : Tannik Asit

TCP : 3,5,6-trikloro-2-pridinol

USEPA : Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı

WST-1 : (2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfofenil) -2 H tetrazolyum monosodyum tuzu)

Zn : Çinko

2,4 D : Diklorofenoksiasetik Asit

ÖZET

DOKTORA TEZİ

HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ ve SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS, TANNİK ASİT ve ÇİNKONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevil EROL
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Programı

Danışman : Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos (CPF), yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür. Organofosfatlı insektisitler, insanlarda ve hayvanlarda asetilkolinesterazın etkinliğini dönüşümsüz olarak engeller ve vücutta nöromusküler kavşaklarda, kalp kasında, düz kasta, merkezi sinir sisteminde bulunan kolinerjik sinapslarda asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenmeye yol açarlar. Organofosfatlı pestisitlere maruz kalmak, kanserin, nörodejeneratif kronik hastalıkların, nörotoksisitenin, üreme ve gelişimsel bozukluğunun ve birçok organ fonksiyonunun bozulmasında risk faktörüdür. Tannik asit (TA) antioksidan, antiinflamatuar gibi birçok özelliği ile geleneksel ve modern tıpta kullanılmakta olan bir polifenoldür. Çalışmamız insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK293 hücre hattına klorpirifos, çinko ve tannik asitin farklı doz ve sürelerde uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olası etkilerini araştırmak üzere planlanmıştır. Çalışmada deney grupları; 1. kontrol grubu, 2. grup klorpirifos grubu, 3. grup tannik asit grubu, 4. grup çinko grubu olarak belirlenmiştir. Klorpirifos, tannik asit ve çinko'nun HEK 293 hücrelerinde hangi dozlarda ve hangi sürelerde daha etkin olduğunu belirlemek ve hücre canlılığı üzerine olan etkilerini görmek amacıyla MTT ve xCELLigence analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla 10, 30, 60 ve 90 µg/mL klorpirifos, 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit ve 25, 50, 75, 100 ve 150 µM çinko oksit eklenerek hazırlanmış besiyeri ile ekilen hücreler standart hücre kültürü ortamında inkübe edildi. Çalışma sonunda klorpirifosun hücre canlılığı üzerinde özellikle yüksek dozlarda etkili olduğu ve canlılığı daha çok azalttığı görülmüştür. Tannik asitin hücre canlılığını artırmada etkili dozunun 10µM olduğu ve yüksek dozlarda canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Çinkonun hücre canlılığını üzerinde özellikle yüksek dozlarda çok daha olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Klorpirifosun hücre canlılığını azalttığını, tannik asit ve çinkonun ise doza ve zamana bağlı olarak etki gösterdiğini, ayrıca farklı iki analiz yönteminin birbirini destekler yönde sonuçlara ulaştırdığını bildirmekteyiz.

Ekim 2022, 124 sayfa.

Anahtar kelimeler: Klorpirifos, Tannik asit, Çinko, HEK 293, Hücre Canlılığı Analizi

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS, TANNIC ACID AND ZINC APPLIED TO HEK 293 CELLS IN DIFFERENT DOSES AND DURATIONS ON CELL VITALITY

Sevil EROL
Istanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biophysics

Biophysics Program

Supervisor : Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

Chlorpyrifos (CPF), an organophosphate pesticide, is a widely used insecticide. Organophosphate insecticides irreversibly inhibit the activity of acetylcholinesterase in humans and animals and cause poisoning by causing accumulation of acetylcholine at neuromuscular junctions, heart muscle, smooth muscle, and cholinergic synapses in the central nervous system. Exposure to organophosphate pesticides is a risk factor for cancer, neurodegenerative chronic diseases, neurotoxicity, reproductive and developmental disorders, and deterioration of many organ functions. Tannic acid (TA) is a polyphenol used in traditional and modern medicine with its many properties such as antioxidant and anti-inflammatory. Our study was planned to investigate the possible effects of the application of chlorpyrifos, zinc and tannic acid at different doses and durations on the cell viability of the HEK293 cell line, which is a human embryonic kidney cell. Experimental groups in the study; The 1st the control group, the 2nd group was the chlorpyrifos group, the 3rd group was the tannic acid group, and the 4th group was the zinc group. MTT and xCELLigence analysis methods were used to determine which doses and durations of chlorpyrifos, tannic acid and zinc were more effective in HEK 293 cells and to see their effects on cell viability. For this purpose, cells cultured with a medium prepared by adding 10, 30, 60 and 90 µg/mL chlorpyrifos, 5, 10, 15, 20 and 25 µM tannic acid and 25, 50, 75, 100 and 150 µM zinc oxide were incubated in standard cell culture medium. At the end of the study, it was observed that chlorpyrifos was effective on cell viability, especially at high doses and reduced viability more. It has been determined that the effective dose of tannic acid in increasing cell viability is 10µM and that viability decreases at high doses. It has been determined that zinc has a much more positive effect on cell viability, especially at high doses. We report that chlorpyrifos reduces cell viability, while tannic acid and zinc act depending on dose and time, and that two different analysis methods provide results that support each other.

October 2022, 124 pages.

Keywords: Chlorpyrifos, Tannic acid, Zinc, HEK 293, Cell Viability Analysis

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde ve kontrolsüzce artması, tüketime bağlı olarak gıdaya olan ihtiyacı sürekli olarak artırmakta ve yeterli miktarda ürün sağlanamamaktadır. Bugün dünyada ve ülkemizde ürün miktarındaki artışı sağlayabilmek amacıyla tarımda çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" olarak adlandırılan çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak tarımda kullanılan bu ilaçlar, toprakta, suda ve ürünlerin üzerinde uzun zaman hiç bozulmadan kalabilmekte ve besin zinciri ile insanlara kadar ulaşmaktadır [1,2].

Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür. Klorpirifos, daha çok temas yoluyla ve mide zehiri olarak etki eder. Dış parazitlerde ve konakçı organizmalarda kolinesteraz enzimiyle birleşip onu inhibe ederek etkisini gösterir. Organofosfatlı insektisitler, insanlarda ve hayvanlarda asetilkolini (ACh) parçalayan asetilkolinesterazın (AChE) etkinliğini dönüşümsüz olarak engeller ve vücutta nöromusküler kavşaklarda, kalp kasında, düz kasta, postganglionik parasempatik sinir uçlarında, otonomik gangliyonlarda ve merkezi sinir sisteminde bulunan kolinerjik sinapslarda asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenmeye yol açarlar [3,4].

Organofosfatlı insektisitler, postsinaptik membranlardaki muskarinik ve nikotinik reseptörleri uyarır ve zehirlenen hayvanlarda nikotinik, muskarinik ve santral etkiler meydana gelir. Toksisiteyi, kimyasal ve fizyolojik faktörler, ısı, ilacın uygulandığı doz, uygulanma yolu ve diğer kimyasal maddelerle bir arada kullanılıp kullanılmadığı gibi faktörler etkilemektedir [3]. Pestisitlerin bir grubu olan organofosfatlı insektisitler içinde yer alan klorpirifos'un serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı ve oksidatif doku hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir. Oluşan radikallerin, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaksiyonları başlattıkları bilinmektedir [5]. Reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasını ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla antioksidan savunma mekanizmaları etkin rol oynarlar [6]. Gerek sağlıklı gerekse tümör modelli hücre hatlarında antioksidan özellikli maddelerin prooksidan ve antioksidan etkinliklerinin belirlenmesi son yıllarda yapılan çalışmalarda oldukça sık yer almaktadır.

Bu çalışmada, klorpirifos ile antioksidan ve prooksidan özellikte de olabilen tannik asitin ve çinko elementinin insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK293 hücre hattında süre ve doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine olan etkisini MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] ve xCELLinge metodları ile incelemeyi amaçladık.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Pestisitler

Pestisitler, zararlı organizmaları yok etmek amacıyla kullanılan sentetik organik bileşiklerdir [7]. Pestisitler; tarımda üretimi artırma hedefiyle çok geniş kullanım alanına sahip olan kimyasallardır ve tarımsal ürünlerin azalmasına ya da zarar görmesine sebep olabilecek hastalıklar, zararlılar, yabancı otlar gibi çeşitli faktörlere karşı kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Pestisitler; insektisit, herbisit, fungusit, nematosit, akarisit, mollusisit gibi etkili oldukları canlıya göre isimler alırlar ve organofosfatlı, klorlu, fenol türevli, nitro bileşikli gibi yüzlerce farklı kimyasal yapılara sahiptirler. Pestisitler, kimyasal bir madde, dezenfektan olabileceği gibi bakteri ya da virüs gibi biyolojik bir ajan da olabilir [8].

2.1.1. Pestisitlerin Tarihçesi

Pestisitlerin varlığı çok eski tarihlere, M.Ö. 1500 yıllarına dayanmaktadır. Bu tarihlere ait olan bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarıyla mücadele amacıyla kullanılan insektisitlerin hazırlanışını anlatan kayıtlara rastlanmıştır. Mezapotamya'da 4500 yıl önce antik Sümer'de kullanılmış olan elementel kükürt tozu, bilinen ilk pestisittir. Kükürtün hem fungusit ve hem de insektisit özelliğine sahip oluşu 3000 yıl önce biliniyordu. 15. yüzyılda tarım ürünlerindeki zararlıların öldürülmesinde toksik kimyasallardan olan arsenik, civa ve kurşun kullanılmıştır. 19. yüzyılda iki doğal pestisit kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar; krizantemden ve tropik bitki köklerinden elde edilen pyrethrum (pire otu) ve rotenondur [1, 8, 9].

Pestisitlerin kullanımları ve sayıları 1940'lı yıllarda artmıştır. İlk kez 1943 yılında DDT'nin pestisit olarak insanlığın hizmetine girdiği ve 1945 yılında DDT'nin hayvan sütünde saptanması ile ilgili yayınlar vardır. 1948 ve 1951 yılında ise DDT'nin insan adipoz dokusunda ve meme sütünde belirlendiği yayınlarda belirtilmiştir. Sıçanlar ve fareler üzerinde DDT etkileri araştırılmış ve bu maddenin karaciğer kanserine, lenf kanserine ve akciğer kanserine yol açtığı belirlenmiştir [1, 10].

Pestisitlerin önemi 1948 yılında insan vücudunda organik klorlu pestisit kalıntılarına rastlanmasıyla anlaşılmıştır. Bazı pestisitlerin toksikolojik bakımdan zarar oluşturmadığı tespit edilirken, bazı pestisitlerin ise kanserojen özelliğe sahip olduğu ve sinir sisteminde olumsuz etkiler meydana getirdiği tespit edilmiştir. Gıdalar, pestisit kalıntılarının en önemli kaynağıdır. 1960 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü

tarafından “Pestisit Kalıntıları Kodex Komitesi’’ kurulmuştur ve gıdalarda maksimum bulunabilecek pestisit kalıntı değerleri belirlenmiştir [7, 8].

1969 yılında DDT’nin zararlı etkilerinden dolayı kullanımına İsveç’te yasak getirilmiştir. 1970 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri’nde bazı önlemler alınmaya başlanmış, EPA (Çevre Koruma Ajansı) kurulmuştur ve 1971 yılında ise DDT kullanımı tamamen yasaklanmıştır [11].

Türkiye’de ise 1971 yılında pestisitlere yönelik bazı önlemler alınmaya başlanmış öncelikle Dieldrin yasaklanmış, daha sonra 1979 yıında Aldrin, Chlordane ve Heptachlor gibi pestisitler yasaklanmıştır. 1978 yılında ise DDT ve BHC’nin kullanımı kısıtlanmış ve 1985 yılında tamamamen yasak getirilmiştir [10].

Klorpirifosun, insan sağlığı üzerinde oluşturduğu risklerden dolayı Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) 2000 yılında evlerde kullanımını yasaklamıştır. Ancak klorpirifos zararlı etkileri bilindiği halde günümüzde tarımda ve bahçe alanlarında böceklerle ve eklem bacaklılarla mücadele etmek amacıyla kullanılan bir insektisit olmuştur [4].

2.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılmaları

Pestisitler etkili oldukları canlıya, işlevlerine, formülasyonlarına, kökenlerine, kimyasal tiplerine, kullanım şekillerine, etki ettikleri gelişim evrelerine, dayanıklılık sürelerine ve kullanıldıkları yerlere göre farklı şekillerde sınıflandırılırlar [12, 13].

- **Pestisitlerin Etkili Oldukları Canlıya Göre Sınıflandırması**

1. İnsektisit: Böcek öldürücü
2. Herbisit: Yabancı ot öldürücü
3. Fungisit: Mantar öldürücü
4. Akarisit: Akar öldürücü
5. Bakterisit: Bakteri öldürücü
6. Virüsit: Virüs öldürücü
7. Rodentisit: Kemirgen öldürücü
8. Nematisit: Nematod öldürücü
9. Mollusisit: Yumuşakça öldürücü

10. Algisit: Alg öldürücü

11. Afisit: Yaprak bitlerini öldürücü

12. Pedikülosit: İnsan saç biti öldürücü

13. Termitisit: Termit öldürücü

14. Pisisit: Balık öldürücü

15. Avisit: Kuş öldürücü [13].

- **Pestisitlerin İşlevlerine Göre Sınıflandırması**

1. Dezenfektanlar: Bakteriler ve virüsler gibi mikroorganizmaları etkisiz hale getirenler.

2. Desiccants (Kurutucular): Yaşayan bitki dokusunda kurutucu etki gösterenler.

3. Defoliants (Yaprak dökücüler): Bitkilerde yaprak dökücü etki gösterenler.

4. Repellents (Kovucular): Pestler üzerinde koku ya da tat gibi etkilerle uzaklaştırıcı etki gösterenler. Böcek ya da kuşları kaçırıcı etki gösterirler.

5. Pheromons (Çekiciler): Böcekleri kendilerini yok edecek sisteme doğru yönlendirenler.

6. Kemosterilants (Kısırlaştıcılar): Böcekler üzerinde kısırlaştırıcı etki yapan kimyasallardır.

7. Büyüme düzenleyiciler: Böcekler üzerinde ve bitkiler üzerinde büyümeyi geciktirmek ya da büyümeyi hızlandırmak şeklinde etki bırakanlar [14].

- **Pestisitlerin Kimyasal Özelliklerine Göre Sınıflandırması**

Organofosfatlar, klorlu hidrokarbonlar, N-metil karbamatlar, ditiyokarbamatlar, fenoksi-alifatik asitler, arsenikler, fenol türevleri, organotinler, piretroidler, mikrobiyaller, botanik kökenli maddeler olarak sınıflandırılırlar [14].

- **Pestisitlerin Formülasyonlarına Göre Sınıflandırması**

Toz halindeki ilaçlar, suda çözülebilir ilaçlar, emülsiyon halinde, solüsyon konsantre ilaçlar olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca sıvı tohum, toz tohum ilaçlar, kapsül şekli verilmiş formulasyonlar, tabletler, granüller, yazlık ve kışlık yağlar, aerosoller, zehirli yemler, kuru akışkanlar sayılabilir [11].

Pestisitlerin Kullanım Şekillerine Göre Sınıflandırılması

Kullanım şekillerine göre gaz, püskürtme ve toz şeklinde olabilirler [11].

Pestisitlerin Kökenlerine Göre Sınıflandırması

1. İnorganik maddeler

2. Sentetik organik maddeler: Klorlu hidrokarbonlar, Organik fosforlular, Azotlu bileşikler, Piretroidler.

3. Doğal organik maddeler: Bitkisel maddeler, Petrol yağları vb. [11].

Pestisitlerin Etki Ettikleri Gelişim Evrelerine Göre Sınıflandırması

1. Larvasit: Larva öldürücü

2. Ovisit: Yumurta öldürücü

3. Adultisit: Erişkin öldürücü [11].

Pestisitlerin Kalma Sürelerine Göre Sınıflandırması

1. Kalıcılığı olmayan pestisitler: Birkaç gün etkisini sürdürürler ya da en fazla 12 hafta kadar etkisini sürdürürler.

2. Orta derecede kalıcılığı olan pestisitler: 1ay ile 18 ay arasında etkisini sürdürürler.

3. Uzun süre kalıcılığı olan pestisitler (Persistent): 20 yıl kadar dayanabilirler. DDT, aldrin, dieldrin gibi birçok klorlu hidrokarbonlar bu gruba girer.

4. Sürekli kalıcı pestisitler (Permanent): Civa, kurşun, arsenik bu gruba girer [14].

Pestisitlerin Kullanım Alanlarına Göre Sınıflandırması

1. Tarımda kullanılan pestisitler
2. Endüstride kullanılan pestisitler
3. Ev ve bahçecilikte kullanılan pestisitler
4. Ormancılıkta kullanılan pestisitler (Kereste korumacılığı)
5. Hayvancılıkta kullanılan pestisitler
6. Balık yetiştiriciliği alanında kullanılan pestisitler
7. Sucul bölgede böcek kontrolü için kullanılan pestisitler

8. İnşaatta kullanılan pestisitler (Duvar kağıdı yapıştırıcıları, boya, sıva vb.)
9. Gıda saklanması alanında kullanılan pestisitler
10. Süs amaçlı bölgelerde kullanılan pestisitler (Parklar, bahçeler, oyun alanları)
11. Toplum hijyeni alanında böcek kontrolünde [14].

Pestisitlerin formülündeki aktif bileşen ile birlikte eklenen bazı bileşikler de pestisit ile birlikte kullanılmaktadır.

Bunlar;

- **Solventler:** Çözücü maddelerdir. Pestisitlerin çoğunda solvent olarak su kullanılmaktadır.
- **Sürfaktanlar:** Sıvı yüzey gerilimini azaltan maddelerdir. Sıvıların yapışmalarını ve yayılmalarını artırırlar.
- **Taşıyıcılar:** Pestisitlerin kullanımlarını kolay hale getirmek amacıyla içerisine bırakılan katı ya da sıvı maddelerdir.
- **Güvenlik amacı ile kullanılan maddeler :** Pestisitlerin ürünlere zarar vermelerini önlemek amacıyla eklenen maddelerdir. (Safeners)
- **Adjuvant:** Pestisitlerin etkisini artırmak amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallardır. Adjuvantların pestisitin etkin maddesi olmaksızın etkileri bulunmamaktadır [13, 14].

2.1.3. Dünya'da ve Türkiye'de Pestisitlerin Kullanımları

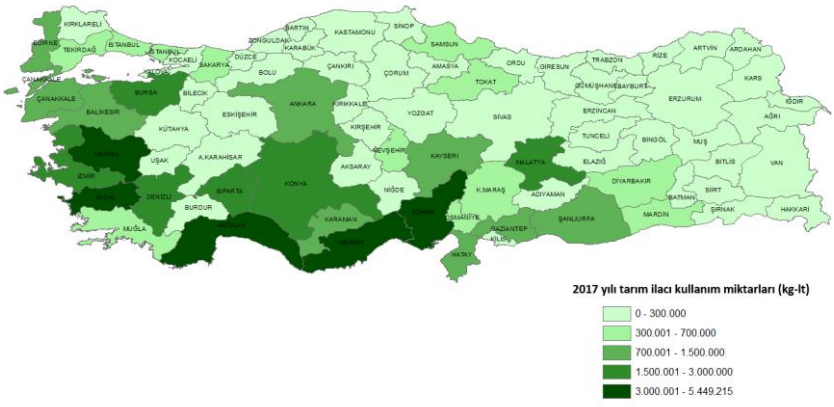
Dünya'da bir yılda ortalama olarak 2,5 milyon ton pestisit kullanıldığı bilinmektedir. Her yıl 3 milyona yakın insanda, pestisitlerden kaynaklı zehirlenmeler görüldüğü WHO raporlarında mevcuttur ve bu pestisit zehirlenmelerinin 220.000'i ölümle sonuçlanmaktadır [15]. Dünyada pestisit kullanımı daha çok ABD, Fransa, Çin, Japonya ve Brezilya gibi gelişmiş ülkelerdedir. Pestisitlerin sağlık üzerinde bıraktığı etkilere çoğunlukla gelişmekte olan ükelerde rastlanmıştır [16].

Pestisit tüketim miktarları açısından bakıldığında Latin Amerika ülkeleri dünyada birinci sırayı almaktadır. Hollanda ve İtalya ise Avrupa Birliği ülkelerinde en çok pestisit kullanan ülkelerdir [17].

Türkiye'de tarım ilacı kullanımına II. Dünya savaşı bittikten sonra başlanmıştır, 1960 yılından sonra ise kullanımı yaygınlaşmıştır. Türkiyede kullanılan tarım ilacı yıllık ortalama 40 bin ton civarında olup gelişmiş ülkelerde kullanılan miktar ile kıyaslandığında onlardan daha düşüktür. Ayrıca yıllara göre tarım ilacı kullanımı da değişim göstermiştir. Pestisit kullanımı 1979 yılına kıyasla 2002 yılında % 45,29 artmıştır. Fakat, 2002'den 2009 yılına kadar artış oranı % 9,26 olmuştur [8, 18].

Türkiye'de pestisitler daha çok tarımsal amaçlı olarak kullanılır ve insektisit kullanımı %47, herbisit kullanımı %24, fungusit kullanımı ise %16'lık bir paya sahiptir. Tarımda insektisit satışlarının %47'si pamukta, %20'si meyve pazarında kullanılmak amacıyla gerçekleştirilmektedir. İnsektisit satışlarında %40 oranla organofosfatlı insektisitler ilk sırayı almaktadır [19].

Türkiyede 2015 yılı verileri doğrultusunda, bölgelere göre tarım ilacı kullanım yüzdelerine bakıldığında %28'lik oranla en fazla Akdeniz'de, daha sonra %25'lik oranla Ege'de, %16'lık oranla İç Anadolu'da, %16'lık oranla Marmara'da, %6'lık oranla Doğu Anadolu'da, %5'lik oranla Güney Doğu Anadolu'da ve %4'lük oranla Karadeniz bölgesinde kullanıldığı belirlenmiştir [18].



Şekil 2.1. 2017 yılında Türkiye'de illere göre tarım ilacı kullanım oranları [20].

2017 yılında Türkiye'de illere göre tarım ilacının kullanılma oranlarına bakıldığında **(Şekil 2.1)** sırasıyla daha çok Akdeniz bölgesinde, Ege'de, İç Anadolu'da, Marmara'da, Doğu Anadolu'da, Güney Doğu Anadolu'da ve Karadeniz bölgesinde kullanıldığı görülmektedir. [20]. Doğu Akdeniz bölgesinde Çukurova, Antalya ve Amik ovaları yoğun tarımsal faaliyet içerisindedir.Türkiye'de en yoğun pestisit kullanımına sahip ilk üç il Antalya, Adana ve Mersin'dir [17].

2020 yılında “bitki sağlığı değerlendirme toplantısı” yapılmış ve alınan kararlara göre klorpirifos etil, klorpirifos metil gibi pestisitlerin kullanımlarında doz aşımından dolayı problem yaşanmaması için İl ve İlçe Müdürlükleri tarafından gerekli tedbirlerin alınmasına karar verilmiştir. [21].

Türkiye’de tarım ilacı kullanım oranı dünyadaki kullanımın %1’i kadardır. Türkiye’nin kırsal bölgelerinde meydana gelen zehirlenme olaylarında en çok karşılaşılan maddeler organofosfatlardır [15]. Pestisitlerin, daha çok ihracata yönelik yoğun tarımın gerçekleştiği, sebzelerin ve meyvelerin bolca yetiştirildiği bölgelerde kullanıldığı tespit edilmiştir [22].

2.1.4. Pestisitlere Doğrudan ve Dolaylı Olarak Maruz Kalma Yolları

Pestisitler, tarım alanlarına uygulandıklarında; uygulama şekline de bağlı olarak önce toprağa, suya ve havaya geçmekte, daha sonra da toprakta, havada ve suda yaşamını sürdüren tüm canlılara geçmektedir [8].

Toksikolojik araştırmalara göre pestisitlerin deri yoluyla, ağız yoluyla ve solunum yoluyla vücuda nüfuz ederek insanlarda zehirlenmelere yol açtığı belirlenmiştir [8]. Pestisitler; hava, su ve topraktan doğrudan ya da dolaylı olarak insana ulaşmaktadır.

İlaçlı tohumların insan besini ve hayvan yemi olarak kullanılması, pestisit uygulanmış meyve ve sebzelerin yenilmesi, intihar amaçlı ve kasıtlı olarak pestisitlerin kullanılması, pestisit kaplarının başka amaçlarla kullanılması diğer önemli zehirlenme ve maruz kalma sebepleridir [23].

- **Hava ve Pestisitler**

Pestisitler havaya karıştığında, rüzgârlarla taşınarak, sis ve yağışlarla tekrar yeryüzüne dönebilirler. Pestisitler hava yolu ile hedef dışı diğer bitkilere ve organizmalara ulaşarak bu organizma ve bitkilerde zararlı kalıntılara ve toksisitede artışa yol açabilirler [8].

Hava ortamında; püskürtme yöntemiyle kullanılan pestisitler çok uzak bölgelere kolayca taşınabilir. Havada kolayca taşınmaları nedeniyle kontrol edilmesi zor olan pestisitler, su kaynaklarına, yeşil alanlara ve evlere kadar ulaşarak; hassas olan bitkilere, yaban hayatına, evcil hayvanlara ve insanlara zararlı etki gösterebilirler. Ülkelerin çoğunda, pestisitlerin havada sürüklenmesine engel olmanın zor olması sebebiyle hava yolu ile ilaçlamalar tercih edilmemekte ve kısıtlanmaktadır [8].

Su ve Pestisitler

Pestisitler toprağa ve bitkilere uygulanmalarından sonra toprak yüzeyinde kalabilirler ve yağmur suları ile birlikte yüzey akışı ya da toprak içerisinde aşağı doğru ilerleme şeklinde su kaynaklarıyla kolaylıkla temas edebilirler. Yeraltı kaynak suyu kirlendiğinde; nehirlere ve göllere de ulaşarak buralarda da pestisit kalıntılarına rastlanmasına sebep olabilirler [8].

Doğal su kaynaklarının yakınında bulunan bitki ve böceklere uygulanan ilaçlar; doğrudan suya karışabilirler, ayrıca ilaç endüstrisi atıklarının doğal su kaynaklarına atılması; uygulamada kullanılan aletlerin ve kapların su kaynaklarının içerisinde temizlenmeye çalışılması yoluyla da su kaynaklarına bulaşabilirler. 2000 ile 2002 yılları arasında yapılan bir araştırmada Küçük Menderes'te metal kalıntılarının ve organik klorlu pestisitlerin olup olmadığı araştırılmış ve bunlara rastlandığı tespit edilmiştir. Nehir suları içerisinde daha çok karşılaşılan pestisit DDT'dir [8].

Sulardaki insektisit kalıntıları, besin zinciri yoluyla da, suda yaşayan omurgasız canlılarda, balıkların vücudunda kalabilirler. Herbisitlerin su ortamında besin zinciri yolu ile öncelikle planktonlarda, daha sonra alglerde, omurgasızlarda, bitkilerde ve balıklarda birikmesi ile besin zincirindeki herbisit derişimini zamanla artırmaktadır ve bu balıkları tüketen insanlara kadar ulaşmaktadır [6, 8].

Konya'da tüketilen 18 farklı balık türünde organik klorlu pestisit kalıntılarının varlığı araştırılmış ve sonuçta 14 tane değişik organik klorlu pestisit tespit edilmiştir. İstavrit, palamut ve alabalık hariç diğer balık türlerinin hepsinde varlığına rastlanmıştır [8].

Toprak ve Pestisitler

Tarımda kullanılan ilaçlar doğrudan toprağın üst ve iç kısmına, bitkinin üst kısmına ya da tohumları korumak amacıyla tohumlara uygulanmaktadır. Pestisitler bitkilere sprey şeklinde, toprağa püskürtme şeklinde uygulanmaktadır. Bitkilerin üst kısmına uygulanan ilacın çoğu toprağa ulaşmaktadır. Toprağın iç kısmına geçen pestisitler, kapiller su aracılığı ile toprağın üst kısmına taşınabilmekte ve daha sonra tekrar buharlaşma yolu ile havaya karışabilmektedirler. Ayrıca pestisitler mikroorganizmaların doğaya yararlı faaliyetlerini engellemekte ve toprak verimliliğini artıran solucanların ölmesine neden olmaktadırlar [8, 24].

Tarımsal üretimde ürün kaybını önlemek amacıyla, bu kayıba sebep olan tüm yabancı otların, zararlıların ve hastalıkların ortadan kalkmasına yönelik yapılan ilaçlamaların

ancak %0.015 ile %6 oranları arasında bir kısmı hedeflenen canlıya ulaşmaktadır. %94.0 ile %99.9 oranları arasındaki büyük kısmı ise hedeflerin dışındaki organizmalara, toprağa etki etmekte ve onlara zarar vermektedir [25].

- **Sindirim ve Pestisitler**

Kazayla ya da intihar amacıyla içme suyuna ve gıdalara eklenen pestisitler vücuda sindirim sistemi aracılığıyla girerler [23]. Brezilya'da Mato Grosso do Sul'de daha çok 15 ile 49 yaşları arasındaki erkeklerde akut pestisit zehirlenmelerin %37,3'ü, Japonya'da ise %70'inin intihardan kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. [26].

2.1.5. Gıdalardaki Pestisit Kalıntılarının Etkileri ve Pestisitlerin Analiz Edilmesi

Tarımda organofosfat pestisitlerin kullanımı, yem hammadesi bitkilerle beslenen hayvanlarda üreme sisteminde bozukluk oluşturabilmektedir. Bitkilerin insanlar tarafından doğrudan tüketimi ile oluşabilecek risklerin yanında hayvansal kaynaklı et ve süt ürünlerinin de insanlar tarafından tüketilmesi ile pestisitlerin olumsuz etkilerine maruz kalma olasılığı artmaktadır [27].

Türkiye'de Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığına bağlı Zehir Araştırmaları Müdürlüğü Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında gıda maddelerinde, içme ve kaynak sularında pestisitlerin varlığı ve miktarının tespiti için analizler yapılmaktadır [19]. Laboratuvara 2001 ile 2007 yılları arasında zehirlenme şüphesi ile gönderilen numune sayısı 2605 olup pestisit tespit edilen numune sayısı 63 olmuştur. 2001-2007 yılları arasında analizi yapılan numuneler içerisinde en çok rastlanılan pestisitler organofosfatlı insektisitler olup bunların %31,81'ini diklorvos, %27,27'sini metil paratiyon, %22,72'sini klorpirifos oluşturmaktadır. [19].

Gıdalardaki ve sulardaki pestisit kalıntıları ve pestisit etken maddelerinin nitel ve nicel olarak analizleri gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile yapılmaktadır [19].

İnsanlar yaşamları süresince kimyasal kirleticilerin yaklaşık %90'ını vücuda besin tüketimi yoluyla almaktadır [17]. İnsektisit kalıntıları, hayvanlar tarafından hem çevreden hem de yemlerdeki katkı maddelerinden alınarak ette, sütte, yumurtada, balda birikmesi sonucu bu gıdaları tüketen insanlara ulaşırlar. Yapılan bir araştırmada Hindistan'da beyaz Leghorn ırkına sahip tavukların yemlerine 37 hafta boyunca 6.25 ile 50 mg/kg arasında değişen dozlarda DDT eklenmiştir. Uygulamada kalıntıların çoğu tavukların yağ dokusunda bulunmuş ve daha sonra ise karaciğerde, kalpte, yağlı ette, kanda, dalakta, testiste, beyinde ve yumurta sarısında olduğu belirlenmiştir [23].

Pestisitler sucul ekosistemlere karıştığında besin zincirine girmiş olurlar ve bu şekilde hedef dışı canlılara ve insanlara zarar verirler. Pestisitlerin balıklarda yoğun bir şekilde birikmesi sonucu bu balıklarla beslenen canlılarda pestisit düzeyleri daha yüksek bir değere ulaşır. Bu nedenle pestisit kalıntılarının su ürünleri gıdalarında düzenli olarak takip edilmesi ve insan sağlığını korumak için risk analizlerinin yapılması gerekir [17, 22]. 2017 yılında Varol ve Sümbül, Türkiye'de Elazığ'daki Keban barajından elde edilen balık ve kabuklu türlerinin dokularında sadece bir organoklorlu pestisit türünün varlığının tespit edildiğini ve kalıntı düzeylerinin kabul edilebilir limitlerin altında olduğunu bildirmişlerdir [17].

Pestisit kalıntılarının olumsuz etkilerinden insan ve hayvanların sağlığını korumak için gıdalarda bulunmasına müsaade edilen düzey maksimum kalıntı limitleri (MRL) ile ifade edilmiştir. Gıdalarda bulunmasına müsaade edilen maksimum ilaç miktarını (ppm) ifade eder [28].

2009 yılında Yunanistan'da koyun ve keçilerin beslenmesinde kullanılan yonca otu, çayır otu, saman, çalılık ve konsantre yem karması (arpa, mısır, buğday ve soya) için yapılan pestisit araştırmasında, yonca otunda sırasıyla 0,08 ve 0,02 mg/kg olarak MRL değerinden daha düşük miktarda olduğu belirlenmiştir. Ancak konsantre yemlerde organoklorlu bir pestisit olan α ve β-endosülfanın sırasıyla 2,82 ve 2,39 mg/kg olarak MRL düzeyinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir [28].

Türkiye'de 1996 ile 2000 yılları arasında tarımsal ürünlerin içinde pestisit varlığını tespit etmek için araştırma başlatılmıştır. Bu projede 63 şeftalide, 137 armutta ve 429 tane elmada pestisit kalıntılarına bakılmıştır. Araştırma sonucunda 2 armutta ve 6 elmada maksimum kalıntı limitlerinin üstünde kalıntı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın devamında 12 üzüm örneğinde trichlorfon, bromoproplate, procymidon, diazinon, malathion, methyl paration, ethion ve chlorpyrifos-ethil kalıntılarının MRL'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir [29].

2011 yılında Konya'da tarımsal ürünlerde pestisit analizleri yapılmıştır ve analizlerin sonucunda ayvada kullanılması yasak olan Klorpirifos'un 8.0 ve 5.0 µg/kg olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer bir araştırmada domateste kullanımı yasak olan Oxamyl kalıntısının 10 µg/kg olduğu ve MRL değerinin 7 katı kadar bulunduğu tespit edilmiştir. 10 tane patlıcanda ise kullanımı yasak olan Oxamyl kalıntısı 107.0 µg/kg düzeyinde yani MRL değerinden 11 kat daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir [29].

2008 yılında, Kahramanmaraş'ta bir okula ait içme suyu olarak kullanılan kuyu çıkışından alınan örnekte organofosfatlı insektisit kalıntısı bulunduğu belirtilmiştir. İnsektisitin okulun etrafındaki tarım arazisinde yapılan ilaçlamalar sonucunda sulama suyu ile taşınarak kuyuyu kontamine ettiği bilgisine ulaşılmıştır. Okulun içme suyuna karışan bu pestisit öğrencilerde baş ağrısı, karın ağrısı ve mide bulantısı gibi belirtiler göstermiştir [30].

2021 yılında Kayseri'de bir çocuğun yediği nar nedeniyle hayatını kaybettiği ve Adli Tıp Kurumu raporuna göre nar üzerinde ikisi yasaklı olan toplamda beş farklı pestisit bulunduğu bildirilmiştir. Tarım ve Orman Bakanlığınca bildirilen verilere göre Türkiye'de 213 tane yasaklı olan pestisit vardır. Ancak denetimlerin yetersiz olmasından dolayı bu yasaklı pestisitler satılmakta ve kullanılmaktadır. Türkiye Büyük Millet Meclisi Tarım Komisyon üyesi Rıdvan Turan "Bahçemde böcek, kırmızı örümcek var ne önerirsiniz sorusu satıcıya sorulduğunda size yasaklı olan klorpirifosu verebilir." şeklinde açıklama yaparak klorpirifosun bilinçsizce kullanımına dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Gıda Mühendisi Bülent Şık da klorpirifosun beş yıl önce yasaklanmasına rağmen kullanıldığını, önlenmesinin ise aslında kolay olduğunu vurgulamıştır [31].

2.1.6. Pestisitlerin Toksisitesi

Pestisitler akut ve kronik toksisite olmak üzere iki şekilde toksik etki oluştururlar.

- Akut Toksisite: Tek bir doz alınması durumunda, kısa sürede ortaya çıkıp belirtileriyle tanımlanabilen etkidir. Akut toksisite ölçüsü, LD_{50} (%50 ölümcül doz) ya da LC_{50} (%50 ölümcül konsantrasyon) şeklinde ifade edilir. LD_{50} değeri popülasyonda %50 oranında ölüm meydana getiren doz olarak belirtilmektedir. Tüm pestisitler için LD_{50} dozu bilinmeli ve açık bir şekilde yazılmalıdır [10, 11, 32].

- Kronik Toksisite: Uzun bir süreçte, öldürücü doz etkisindeki tekrarlı alımlarda meydana gelen toksisitedir [10].

Pestisitler ile birlikte tüm temizlik ve kozmetik maddeleri, ilaçlar, sanayide kullanılan ve insanların maruz olabileceği kimyasal maddeler, besin katkı maddeleri kullanıma geçilmeden önce toksik etkileri bakımından değerlendirilirler. Toksik potansiyeller, in vitro koşullarda hücre kültürlerinde veya in vivo koşullarda deney hayvanları üzerinde araştırılır [32].

Sıçanlarda pestisitlere maruz kalma yolları, LD_{50} dozu ve buna göre belirlenen akut toksisite yönünden sınıflandırılması **Tablo 2.1**'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Pestisitlerin akut toksisite bakımından sınıflandırılması (Sıçanlarda LD_{50} mg/kg) [10].

Sınıflar	Ağız yolu		Deri yolu	
	Katı	Sıvı	Katı	Sıvı
1a. Çok zehirli olanlar	< 5	< 20	< 10	< 40
1b. Zehirli olanlar	5-50	20-200	10-100	40-400
2. Orta derecede Zehirli olanlar	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
3. Az zehirli olanlar	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Tarımda daha çok kullanılan yabancı otlarla mücadele amacıyla kullanılan pestisitler, balıklarda, arılarda, kuşlarda, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef dışı organizmalarda ölümlere sebep olurlar. Ayrıca üremeyi olumsuz etkileyerek, hedef olmayan bu türlerde üremelerin azalmasına ve ekosistemde türlerin sayılarının değişmesine ya da ekosistemin yapısının bozulması gibi uzun dönemli etkilerin gerçekleşmesine neden olurlar [33, 34]. Arılar pestisitlere karşı çok hassastırlar ve polen, nektar, propolis ve bitkilerdeki salgı balında var olan aktif pestisit kalıntısı ile de arılarda zehirlenme meydana gelmektedir. Arıların bu pestisitleri kovana taşıması sonucunda kovandaki koloni popülasyonu da etkilenmektedir. Yapılan bir araştırmada, pestisit dozu arttıkça arıların yaşam süresini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca arılarda öğrenme ve bellek işlevlerini bozduğu, arıların besin toplama davranışlarını ve kovana dönme davranışlarını etkilediği, arıların sosyal iletişimlerini olumsuz bir şekilde etkilediği belirlenmiştir [24, 35].

Genelde tütsü-duman şeklinde uygulanan pestisitler daha zararlıdır ve bunu sprey şeklinde uygulanan pestisitler takip eder. Granüler formları daha az toksik etki gösterirler, sulu-sıvı formda olanlar toz formda olanlara göre uygulandıkları bölgede daha az kalıntı bırakırlar [24].

Ayrıca herbisitlere maruz kalan tarım işçilerinde; multiple myeloma, lösemi, Non-Hodkin's lenfoma ve beyin, mide, dudak, prostat, meme kanseri tiplerinin arttığı tespit edilmiştir. Buğday tarımının çok yapıldığı bölgelerde herbisit kullanımına bağlı olarak %60-90 oranlarında doğum kusurlarının olduğu tespit edilmiştir. Bazı herbisitlerin toksik

etkilerinin kadınlarda kısırlığa yol açtığı, ayrıca insanlarda bağışıklık ve sinir sisteminde tahrip edici özelliklerinin olduğu ve parkinsona yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca glifosatın saman nezlesine ve çocuklarda otizme neden olduğu tespit edilmiştir [1, 34].

2.2. İnsektisitler

Tarım alanlarında ve doğada böceklerle mücadelede kullanılan pestisitlere "insektisit" denilmektedir.

İnsektisitler kimyasal yapılarına göre:

- Organoklorlu insektisitler
- Organofosfatlı insektisitler
- N- karbamat türevleri gibi organik yapıya sahip olan insektisitler
- Kalsiyum arsenat gibi anorganik yapıya sahip olan insektisitler
- Bitkisel kaynaklı insektisitler (Nikotin, piretrum,toksafen gibi) şeklinde ayrılırlar [2].

Organofosfatlı pestisitlerden en çok bilinenler; Paration metil, Diazinon ve Klorpirifos ($C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$)'dur. Organoklorlu insektisitler dayanıklı bileşiklerdir ve toprakta uzun süre kalabilirler, suda çözünmezler ve kolayca buharlaşmazlar. Organoklorlu pestisitler yağda çok hızlı çözünme özelliğine sahiptirler, bu özelliklerinden dolayı yağ dokusunda birikip canlı organizma üzerinde zararlı etki bırakabilirler. Organoklorlu pestisitlerden en çok bilinen örnekler; DDT, aldrin, endrin, lindan, heptaklor, klordandır ve organoklorlu insektisitlerin kanserojen etkisi bilinmektedir [36].

İran'da pestisit zehirlenmeleri ile 7000 kişide yapılan araştırmada, pestisit zehirlenme oranı %19,2 bulunmuştur ve bunun %57'sinin sebebinin organofosfatlı tarım ilaçları olduğu tespit edilmiştir. Sri Lanka'da pestisitten kaynaklı zehirlenmenin %39,3'ü karbamatlı ve organofosfatlı insektisitlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Japonyada da yapılan benzer bir araştırmada olguların %36'sının organofosfatlı insektisitlerden zehirlendiği ve bu oranı %20'lik oranla herbisitlerin, %6'lık oranla da karbamatların izlediği belirtilmiştir [26].

Kimyasal insektisitler nörotoksikan özelliktedir ve hedefledikleri organizmalarda sinir sisteminde toksik etkiler göstermektedirler. Böceklerin perifer ve merkezi sinir sistemleri memelilerinkine benzer şekildedir ve çok gelişmiştir. Bu sebeple insektisitlerin bütün türlerde etkiledikleri organlar ve gösterdikleri toksik etkiler aynıdır. Toksik etki; doz, maruz kalma süresi, biyotransformasyon hızı ve absorbsiyon yoluna bağlıdır. İnsektisitlerden organik

klorlular ve piretroidler, sinir sisteminde potasyum, sodyum, klorür iyonlarının membran transportunu interfere ederek, organofosfatlar, karbamatlar gibi insektisitler ise sinir uçlarındaki kimyasal nörotransmitterlere etki ederek veya spesifik enzimleri inhibe ederek nörotoksisitelerini gösterirler [2].

2.3. Organofosfatlı İnsektisitler

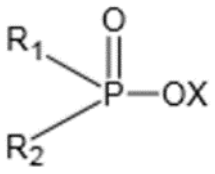
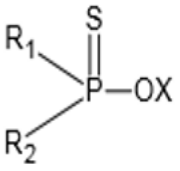
Klorpirifosunda içinde bulunduğu organofosfatlı insektisitler, dünyada en çok kullanılan insektisit grubudur ve insanların dermal, gastrointestinal ve inhalasyon yoluyla bunlara maruziyeti her yıl zehirlenmelere ve ölümlere yol açar [26].

2.3.1. Organofosfatlı İnsektisitlerin Özellikleri

Organofosfatlar, etken maddeleri fosfor atomu olan triester yapısında, fosforik asit türevleridir. Genel olarak organofosfatlı insektisitler, fosforik asidin tiyol veya amid türevleridir. Organofosfatlar, sinir sisteminde etki meydana getiren kimyasallardır [2, 13, 37].

Organofosfatlı insektisitler, fosfonik, fosforik, fosforotioik, fosfonotioik gibi fosfor içeren asitlerin ester, tiyol ve amid türevleridir. **Tablo 2.2**'de görüldüğü gibi organofosfatlı insektisitlerin genel kimyasal yapısı, merkezde yer alan bir fosfor (P) atomuna, oksijen (O) bağlanarak karakteristik fosforik, okson grubu (P=O) veya bir fosfor (P) atomuna kükürt (S) bağlanarak tiyofosforik (P=S) bağından oluşması şeklindedir. Asetikolinesteraz (AChE) enzimini, yapısında okson bulunan organofosfatlı pestisitler baskılar bu nedenle oksonlar tiyo ile kıyaslandığında daha toksik etkilidir ancak yıkımları daha kolaydır [2, 11].

Tablo 2.2. Organofosfatlı insektisitlerin genel yapıları [2, 11].

Organofosfat türü	Kimyasal yapısı
Okso-fosforik bileşikler	
Tiyo-fosforik bileşikler	

Organofosfatlı insektisitlerin ilkini, 1937 yılında Almanya'da Schrader öncülüğünde bazı kimyagerler sentezlemiştir ve oldukça toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. II. Dünya savaşı sürecinde sinir gazı" olarak da bilinen, sarin (izopropil metilfosfonoafloridat) ve tabun (etil N-dimetilfosforoamidosiyanidat) kimyasal savaş silahı olarak geliştirilmiştir [2, 36]. Sarin, tabun, soman gibi organofosfat yapıdaki sinir gazları dışında klorpirifos, diazinon, malation gibi pestisitler de organofosfatlı insektisitlerdir [13].

Organoklorlu pestisitlerle kıyaslandığında akut toksisiteleri daha yüksek olan organofosfatlı bileşikler etkilerini doğrudan veya oksidasyona uğradıktan sonra gösterirler. [36].

Klorpirifosla birlikte en çok bilinen insektisit olan Diazinonun ($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$), kullanımı çok yaygındır ve deri yoluyla temas ve ağız yoluyla mide zehiri olarak etkili olma özelliği vardır. Etkisi daha çok akarisitler, bal arıları ve balıklar üzerinedir. Parazitoit böcekler üzerinde etkisi daha azdır. Meyve ve sebzelerdeki ağ kurtları, yaprak bitleri, kiraz sineği, zeytin güvesi, ekin güvesi vb. zararlılarla mücadele amacıyla kullanılmaktadır [36].

Organofosfatlı pestisitlerin çoğu kimyasal yapılarından dolayı yağda çözünebilirler (lipofiliktir) ve noniyonizedir. Yağda çözünebilme özelliklerinden dolayı kan beyin bariyerini geçebilirler. Organofosfatlar yutma ve solunum yolu ile vücuda girebilir ya da deri yolu ile emilebilir. Deri yolu ile emilim çok yavaştır ancak uzun süre deri yolu ile maruziyet, şiddetli zehirlenmeleri meydana getirebilir. Ağız yolu ve solunumla maruziyet durumunda ise hızlı emilim olur. Emilim sonucunda organofosfatlı insektisitler yağ dokusunda, karaciğerde, böbreklerde ve tükürük bezlerinde birikirler [37, 38].

Zehirlenme durumunun ortaya çıkma hızı ise çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar;

- Maruz kalınmış olan organofosfatlı pestisitin kimyasal yapısı
- Maruz kalınmış olan organofosfatlı pestisitin miktarı
- Maruziyet şekli (Yutma, deri yolu, solunum yolu gibi)
- Metabolik aktivasyon süreci ve yıkım hızıdır [37].

Tablo2.3. Organofosfatlı bileşiklerin toksisite yönünden risk sınıflandırması örnekleri [11, 13].

Sınıf 1a: İleri düzeyde riskli olan organofosfatlı pestisitler (Aşırı tehlikeli olanlar)	
- Chlorfenvinphos - Demeton - Disulfoton	- Parathion - Parathion-methyl - Leptophos
Sınıf 1b: Yüksek riskli olan organofosfatlı pestisitler (Çok tehlikeli olanlar)	
- Bromophos-ethyl - Dichlorvos - Fenthion	- Methamidophos - Thiometon - Triazophos
Sınıf 2: Orta düzeyde riskli olan organofosfatlı pestisitler (Orta derecede tehlikeli olanlar)	
- Fenitrothion - Klorpirifos-etil - Diazinon	- Dimethoate - Ethion - Phosmet
Sınıf 3: Hafif düzeyde riskli olan organofosfatlı pestisitler (Hafif tehlikeli olanlar)	
- Acephate - Bromophos - Malathion	- Menazon - Primiphos-methyl - Trichlorfon
Sınıf 4: Akut zarar vermesi beklenilmeyen organofosfatlı pestisitler (Akut tehlike olasılığı düşük olanlar)	
- Chlorphoxim - Klorpirifos-metil	- Temephos - Tetrachlorvinphos

Tablo 2.3'te de görüldüğü gibi, Diazinon, Fenthion, Ethion ve Klorpirifos-etil orta derece tehlikeli organofosfatlı pestisitlerdir. Organofosfatlı insektisitlerin çoğu toksik etkilere sahip olsalar da genellikle çevrede uzun süre kalıcı olma özellikleri yoktur. Organofosfatlı insektisitler, güneş ışığı, hava ve toprak ile temasta bulunduklarında hidroliz olup parçalanırlar. Organofosfatlı insektisitler organik klorlu insektisitlerle kıyaslandığında daha hızlı parçalanırlar ancak akut toksisiteleri organik klorlulardan daha fazladır [38].

Organofosfatlı insektisitlerin metabolitleri genellikle idrarla, daha az oranda ise dışkı ve solunum yoluyla atılır. Diklorvos gibi organofosfatlı insektisitlerin atılımı daha kolay olup saatler içerisinde atılır ancak klorpirifos etil gibi okson metabolitlerinin atılımı günlerce sürer ve günlerce vücutta kalır [38]. Yapılan bir araştırmada çiçekçilikte çok kullanılan Malathion,

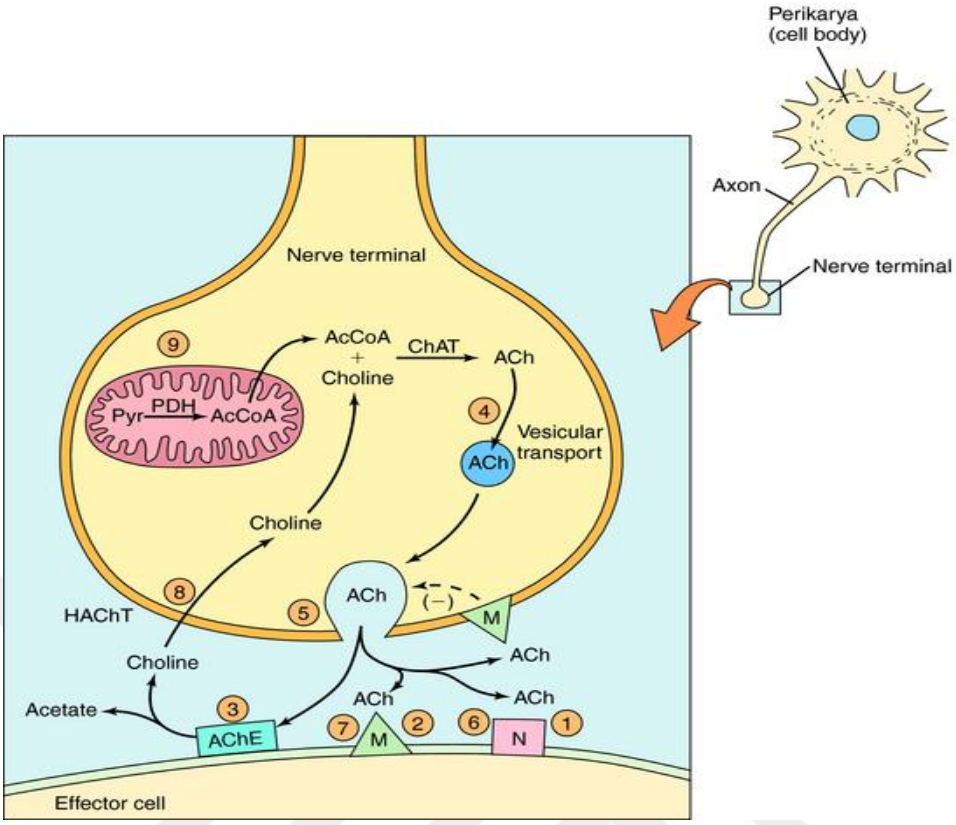
Parathion, Dimethoate, Fenitrothion, DDT ve BHC pestisitlerini, günde 8 saat sprey şeklinde uygulayan işçilerde mesane kanserine yol açtığı tespit edilmiştir [39]. Organofosfatlı pestisitleri uygulayan kişilerin bilinçsizce kullanmaları, gerekli önlemleri almamaları ve denetimlerin de yetersiz olması nedeniyle hem uygulayan kişilerde hem de dolaylı olarak bu pestisitlerden etkilenen kişilerde toksik etkilere maruziyet yaşanmaktadır. Organofosfatlar toksik etkilerini; sitotoksisite, genotoksisite ve immunotoksisite olarak meydana getirirler [40].

2.3.2. Organofosfatların Toksik Etki Mekanizmaları

Organofosfatlı insektisitler, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara farklı şekillerde müdahale ederek toksik etkilerini gösterip akut toksisite ve kronik toksisiteye yol açarlar. Toksisite gerçekleşirken oluşan mekanizma ise; Reseptörler ile etkileşme, enzimler ile birleşme, diğer biyomoleküllere bağlanma ve küçük molekül ya da iyonlarla birleşme (şelasyon) şeklinde olur.

Enzimler, hücredeki fizyolojik olaylarda önemli rolleri olan biyolojik katalizörlerdir. Enzim aktivitesi, organofosfatlı insektisitler gibi herhangi bir kimyasal tarafından yok edilirse enzim inhibisyonu gerçekleşir ve organizmanın dengesi bozularak fizyolojik değişimler sonucu toksisite oluşur [2].

Organofosfatlı pestisitler toksik etkilerini asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonu ile gösterirler. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi, eritrositlerde, periferik ve merkezi sinir sisteminde ve nöromüsküler kavşaklarda bulunur. AChE enziminin en önemli görevleri; nöronlardan ulaşan sinyallerin iskelet kaslarına, düz kaslara, salgı bezlerine, merkezi sinir sistemine (MSS) ve otonom sinir düğümlerine aktarımının doğru bir şekilde sağlanmasıdır. Asetilkolinesteraz, asetilkolin (ACh) nörotransmitterini, asetik asit ve koline dönüştürerek parçalamaktadır **(Şekil 2.2.)** [11].



Şekil 2.2. Asetilkolin (ACh) ve Asetilkolinesteraz (AChE) ilişkisi [41].

AChE enziminin inhibisyonu ile organofosfatlı insektisitlerin oluşturduğu toksik etkiler arasında doğrudan bir ilişki vardır. Organofosfatlar, periferik sinir sisteminde, nöromüsküler kavşaklarda ve eritrositlerdeki AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforilleyerek inaktive ederler [4, 13].

AChE enziminin baskılanması sonucu otonom ve merkezi sinir sistemlerinde, sinir-kas kavşağında ACh birikimi olur. Asetilkolin (ACh) birikimi sonucu kolinerjik reseptörler olan nikotinik ve muskarinik reseptörler aşırı bir şekilde uyarılır. Aşırı uyarılma sonucu sinaptik iletim felci, kolinerjik toksisite oluşur. Bu durum "kolinerjik sendrom" olarak bilinir. Organofosfatlar nörotoksik etkilerini, nöronal kolinesteraz aktivitesini inhibe ederek gösteririler [11, 40]. Nikotinik asetilkolin reseptörleri merkezi sinir sistemi, otonomik gangliyonlar ve iskelet kası miyonöral kavşaklar üzerinde asetilkolin etkisini sağlarken, muskarinik asetilkolin reseptörleri düz kasın miyonöral kavşaklarında, iç ve dış salgı sistemlerinde bulunup, etki gösterirler [2, 5].

Sinir kavşaklarında asetilkolin birikimi salgı bezlerini etkileyerek çok miktarda salgı üretilmesine yol açar. Nikotinik ve muskarinik reseptörlerin aşırı uyarılması sonucu; taşikardi, bradikardi, hipertansiyon, hipotansiyon, solgunluk, midriyazis, miyozis, salivasyon, diyare,

lakrimasyon ve terleme sekresyonlarında artış, karın ağrısı, bulantı-kusma, idrar inkontinansı, nefes darlığı olguları görülür. Çizgili kas bulgularından; kas güçsüzlüğü, kas krampları, kas zayıflıkları ve fasikülasyonlar, santral (merkezi) sinir sistemi belirtilerinden ise; nörotoksisite, uykusuzluk, anksiyete, baş dönmesi, baş ağrısı, emosyonel labilite, halüsinasyon, konfüzyon ve koma gibi durumlar görülebilir. Ayrıca, merkezi sinir sisteminde duyusal ve davranışsal bozukluklar, solunum ve koordinasyonda bozukluklar, akut solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği, hepatotoksisite, teratojenite, motor fonksiyonlarda baskılanmalar, akciğer salgılarında artış, akciğer ödemi, oligospermi, iskelet kaslarında seyirme ve hücrenin paralizi olması gibi durumlar meydana gelir. Geç görülen belirtiler ise, zehirlenme olayından 2 ya da 4 hafta sonra ortaya çıkan polinöropati oluşumu ve buna bağlı olarak gerçekleşen felç durumudur [11, 13, 26].

Organofosfatlı insektisitler insanlarda ve hayvanlarda ayrıca ürogenital sistem, gastrointestinal sistem, immün sistem, endokrin ve metabolik sistem, üreme sistemi, kardiyovasküler ve hematolojik sistem gibi pek çok sistemde kolinesterazları inhibe ederek etki göstermektedir [11, 40, 42].

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda organofosfatlı insektisitlerin hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde değişikliklere sebep olduğu ve farklı dokularda patolojik değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir [40].

Asetilkolinesteraz inhibisyonu, kolinerjik etkilerinin dışında insanlarda ve hayvanlarda insülin salınımını engelleyerek hiperglisemi komplikasyonlarına da neden olmaktadır. Yapılan bir araştırmada, Klorpirifos'un pankreasta Langerhans adacıklarında nekroza ve apoptoza neden olarak pankreatik insülinde azalmaya ve hiperglisemiye yol açtığı belirtilmiştir [4].

Organofosfatların yapılarında fosfora çift bağlı olan sülfür atomu (P=S) bulunur ve bunların toksik duruma dönüşmeleri ancak metabolik olarak oksonlara dönüşmeleriyle gerçekleşir. Organofosfatların yapısında sadece okson (P=O) bulunan bileşikleri asetilkolinesterazı baskılayarak toksik etki oluşturur bu durum "Oksidatif desülfürasyon" olarak adlandırılır. Karaciğer parenkim hücresinin mikrozomal sitokrom P450 enzimleri aracılığı ile katalizlenmesi ile gerçekleşen biyotransformasyon reaksiyonu, organofosfatlı pestisitleri toksik duruma getirir [11, 37].

Genetik polimorfizmler, enzim uyarıcıları ve inhibitörleri gibi faktörlerin etkisi ile sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi kişiler arasında değişkenlik gösterebileceği için

organofosfatlı pestisitlerin metabolik aktivasyon hızları da kişiler arasında farklılık gösterecektir. Sarin, somon ve tabun gibi sinir gazları, yapılarında okson (P=O) grubu bulunduğu için asetilkolinesteraza doğrudan bağlanıp inhibe ederek, oksidatif desülfürasyona gerek duymadan toksik etkilerini gösterebilirler. Bu nedenle sinir gazlarında toksisitede gazların metabolik aktivasyon hızlarındaki değişikliklerin bir önemi yoktur [37].

PON1 (paraoksonaz 1), insan serum paraoksonaz enzimidir. Organofosfatlı pestisitlerin toksikolojisi ile ilgili çalışmaların sonucu PON1 aktivitesinin düşük olması durumunda organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığın artacağı yönündedir. Bu bilgiden yola çıkarak daha düşük PON1 aktivitelerine sahip insanların, organofosfatlardan zehirlenmelerde daha duyarlı olabilecekleri düşünülmüştür. PON1'in en yüksek aktivitesi kanda olup; karaciğerde, bağırsakta, böbrekte ve beyinde de tespit edilmiştir. Memelilerin organlarının çoğunda PON1 aktivitesi var olurken, kuşlarda, balıklarda ve böceklerde PON1 aktivitesi sıfıra yakındır [37].

Organofosfatlı pestisitleri hidrolizleme özelliğine sahip PON1 enzimi, organofosfattan kaynaklı zehirlenmelerde kullanılmak amacıyla terapatik katalitik ajan olarak geliştirilebilir. Organofosfatların detoksifikasyonu, plazmada PON1 gibi A-esterazlar ile katalizlenen hidroliz reaksiyonunu içerir ve bütirilkolinesteraz (BChE), asetilkolinesteraz (AChE) ve karboksilesteraz gibi B-esterazlara stokiyometrik bağlanma reaksiyonlarını içerir. Organofosfatların detoksifikasyonu; paraoksonaz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve karboksilesteraz enzimleri ile gerçekleşir [37].

Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz benzer aktif moleküler yapılar ve merkez yapılar içerirler. Bütirilkolinesterazlara pseudokolinesterazlar (PChE) da denilir. Organofosfatlı insektisitler, PChE aktivitesini de inhibe ederler. AChE'nin kolinerjik sinapslardaki nörotransmiter görevi olan asetilkolini hızlı bir şekilde hidroliz etmesi gibi BChE'de kolinesterazları ortadan kaldıran bileşiklerin ester bağlarını hidrolize etmektedir. Bu nedenle Bütirilkolinesteraz farmakolojik ve toksikolojik bakımdan önemlidir. Organofosfatlar ve diğer nörotoksik kimyasalların etkilerini belirlemede AChE ve BChE önemli biyomarkırlardır [40]. Organofosfatlı bileşikler, omurgalı canlılarda lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese neden olurlar [40].

2.4. Klorpirifos

Klorpirifos tarımda, ormanda, bahçede ve evlerde zararlı böceklerle (tarla kurdu, hamam böceği, sinek, bit, pire, termit gibi) mücadelede yaygın olarak kullanılan, dünya genelinde de en çok tercih edilen bir organofosfatlı insektisittir [11, 43].

Dünya Sağlık Örgütü'nün risk sınıflandırmasına göre Sınıf 2 insektisit grubunda bulunmaktadır ve orta derecede tehlikeli insektisit olarak kabul edilmektedir. Çevre Koruma Ajansı (EPA) 2000 yılında, toksik etkilerinden dolayı Klorpirifos'un evlerde kullanılmasını tamamen yasaklamıştır ve sadece tarımda kullanılmasına izin vermiştir. Klorpirifos; tohumlarda, pamukta, fındıkta, meyve ve sebze tarlalarında uygulanmaktadır. Koyun ve hindi gibi hayvanlarda da direkt uygulaması yapılmaktadır [40, 44].

Klorpirifos'un yaygın kullanımı sebebiyle insanlar ve hayvanlar çok fazla şekilde bu maddeye maruz kalırlar. Klorpirifos, tarımda çok fazla kullanılması nedeniyle, tarımsal sulama sonrasında drenaj sularıyla, yağmur sularıyla, atmosferik çökelme ve dökülmeler yolu ile de taşınabilen ve yeraltı sularına, kaynak sulara ulaşarak dolaylı yollardan da insanlara ulaşabilen bir organofosfatlı insektisittir [43, 45].

Yapılan risk değerlendirme çalışmalarına göre klorpirifos, su canlılarından olan omurgasızlarda, kabuklularda ve böcek larvalarında daha çok toksik etki göstermekte ve balıkların bağışıklık sistemlerini de olumsuz bir şekilde etkilemektedir [45].

Turgut ve arkadaşlarının Manisa, İzmir ve Denizli'de bulunan üzüm bağlarından alınan örnekler üzerinde GS-MS ile yaptıkları analizler sonucunda Manisa'dan alınan 45 numunenin 2 tanesinde klorpirifos etil ve klorpirifos metil olduğu tespit edilmiştir ve miktarlarının da MRL'yi aştığı belirlenmiştir. İzmir'den alınan 10 örnekten 2 tanesinde klorpirifos metil kalıntı miktarının MRL'yi aştığı tespit edilmiştir. Denizli'den alınan 14 örnek içerisinde 1 örnekte klorpirifos etil, 3 örnekte ise klorpirifos metil miktarının MRL'yi aştığı belirlenmiştir. Cesnik ve arkadaşları ise 47 adet şaraplık üzüm örneğini GS-MS analizi ile 67 tane pestisit kalıntısının varlığı bakımından araştırmışlardır ve üzümde en çok bulunan pestisitlerin klorpirifos, folpet, siprodinil, ditiyokarbamat, klorothalonil ve pirimetanil olduğunu tespit etmişlerdir [46].

Tatlı tarafından yapılan bir çalışmada ise, 10 tane çilek örneği incelenmiş olup, 3 örnekte kullanımı tamamen yasaklanmış olan Klorpirifos'un 5.0, 11.0, 10.0 μg/kg düzeyinde

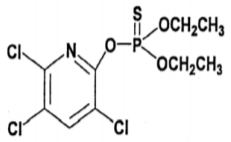
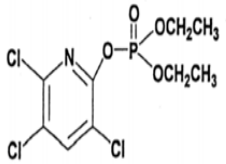
kalıntılarının olduğu tespit edilmiştir [47]. Klorpirifos alınan doza bağlı olarak; teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler göstermektedir [5].

2.4.1. Klorpirifos'un Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Klorpirifos'un moleküler formülü $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ olup, moleküler ağırlığı ise 350,6 g/mol'dür. Beyaz renklidir ve kristal halinde bir yapıya sahiptir. Erime noktası 41,5 ^{0}C, kaynama noktası 160 ^{0}C'dir. Klorpirifos'un, etil ve metil esterleri vardır. Klorpirifos etil ve klorpirifos metil renksiz ve kristalize bir yapıdadır. Klorpirifos etil non-polar bir yapıda olduğu için sudaki çözünürlüğü azdır ve aseton, benzol, kloroform ve metil alkolde kolayca çözünebilir. Klorpirifos metilin de sudaki çözünürlüğü azdır ve benzol, aseton, kloroform, hekzan ve metilalkolde iyi çözünme özelliği vardır. Klorpirifos'un Lorsban, Dursban, Talon, Spannit gibi isimleri de vardır. Uygun saklama koşulları sağlanırsa Klorpirifos uzun süre dayanabilir ancak Klorpirifos bazik koşullarda dayanıksız olan fosfotioat türevi bir organofosfatlı bileşiktir [11, 45].

Apolar bir yapıya sahip olan klorpirifos düşük çözünürlüğe (1.40 mg/L, 25 ^{0}C'de) sahip olması nedeniyle, çevrede hızlıca sudan organik faza geçtikleri için su kaynaklarına transfer olabilmekte ve insanların maruziyet riskini de artırmaktadır. Klorpirifos orta seviyede bir buharlaşma basıncına ($1.88x10^{-5}$ mm Hg, 25 ^{0}C'de) sahiptir. Klorpirifos'un 25 ^{0}C sıcaklıkta ve pH 7,0 olan suda 35 gün ile 78 gün arasında bir yarı ömrü vardır [44]. Orta düzeyde hidrofob olan Klorpirifos, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olup, toprakta kolayca adsorplanır. Toprak altındaki ve toprak üstündeki zararlı böceklerle mücadele amacıyla kullanılan klorpirifosun topraktaki kalıcılığı 20 ile 140 gün arasındadır. Tarımsal akış, püskürtme ve erozyon gibi taşınım yolları ile Klorpirifos topraktan gölet ve baraj gibi su kaynaklarına ulaşır. Su ortamına transfer olduktan sonra mikroorganizmalar ile parçalanır ve sudaki özellikle kabuklu canlılara toksik etkilerini gösterir ve aynı zamanda topraktaki enzim aktivitesini ve mikrobiyal yaşamı olumsuz bir biçimde etkiler. Sudaki yarılanma ömrü 12-41 gün arasında değişmektedir. Toprakta 20 ile 140 gün arasında kalabilir [36, 45].

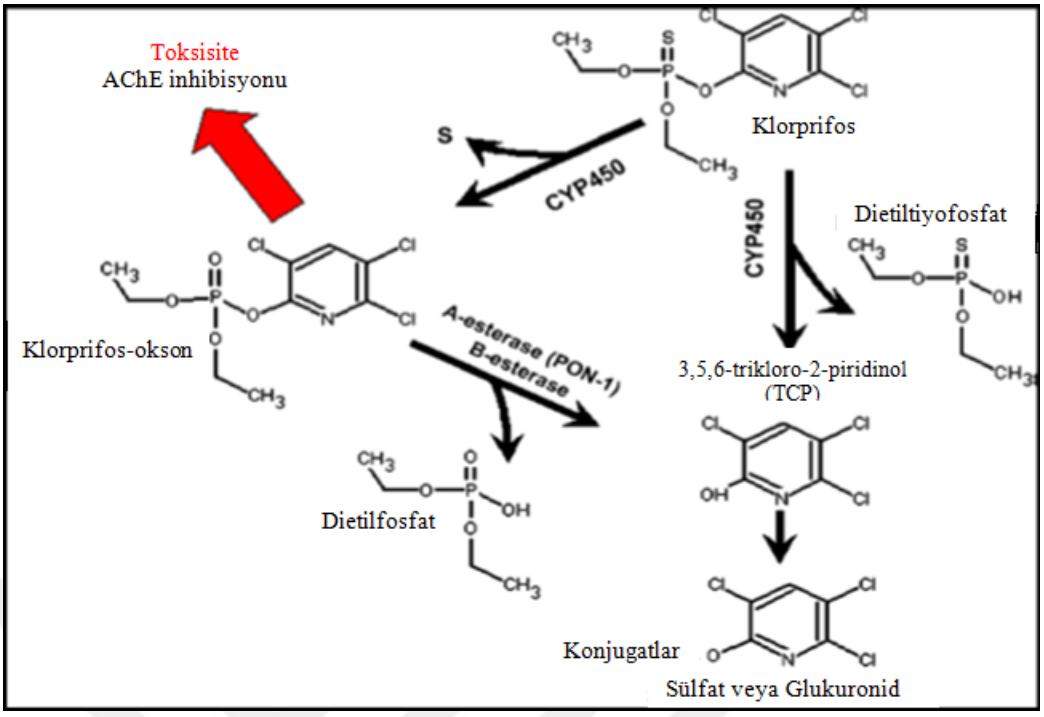
Tablo 2.4. Klorpirifos'un ve Klorpirifos-okson'un kimyasal yapıları [42].

Klorpirifos	Klorpirifos-okson
	

2.4.2. Klorpirifos'un Metabolizması ve Toksik Etki Mekanizmaları

Klorpirifos-okson (CPO), Klorpirifos'un (CPF) metabolitidir ve Klorpirifos toksik etkisini Klorpirifos-okson aracılığı ile gösterir **(Tablo 2.4.)**. Klorpirifos, sitokrom P450 aracılığı ile oksidatif desülfürülasyon sonucu Klorpirifos-okson'a dönüşür. Bir metabolit olan Klorpirifos-okson, asetilkolinesteraza yüksek affinite ile bağlanarak asetilkolinesterazı inhibe eder ve toksik etkisini gösterir [40, 43]. Klorpirifos-okson, A-esteraz ve alinesteraz enzimleri ile karaciğer, böbrek ve akciğerlerde detoksifiye edilmektedir. Sprague-Dawley sıçanlarla yapılmış olan bir çalışmada da A-esteraz ve alinesteraz detoksifikasyon enzimleri oranı en çok karaciğerde, orta düzeyde böbrek ve akciğerlerde, daha az düzeyde ise beyin, dalak ve iskelet kasında tespit edilmiştir [48].

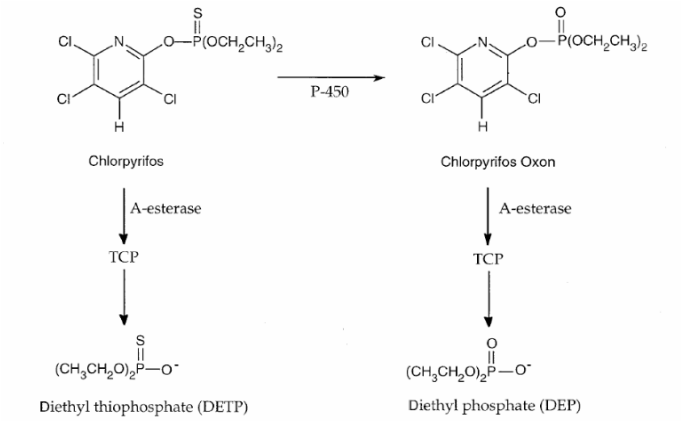
Klorpirifos öncelikle karaciğerde klorpirifos metabolizmasında önemli bir payı olan CYP sistemi aracılığıyla Klorpirifos-okson oluşturarak etkisini gösterir **(Şekil 2.3.)**. Klorpirifos-okson'un paraoksonaz (PON-1) metabolizması ile oksonun deaktive olması sonucu TCP (3,5,6-trikloro-2-pridinol) oluşur. B-esteraz bağırsak ve karaciğerde benzer aktivite gösterirken, bağırsaklardaki PON-1 aktivitesi yaklaşık 100 kat daha düşüktür [49].



Şekil 2.3. Klorpirifos'un biyotransformasyon mekanizması [11].

Klorpirifos-okson, sinir dokuda asetilkolinesteraz inhibisyonu sonucu asetilkolin birikimine yol açan nörotoksik bir metabolittir. Aynı zamanda hepatik ve ekstra hepatik A-esterazlar (PON-1) ve dokulardaki B-esterazlar (kolinesterazlar-ChE) da klorpirifos-oksonu metabolize ederler ve bunun sonucunda 3,5,6-trikloro-2-pridinol (TCP) ve dietilfosfat (DEP) oluştururlar. Klorpirifos, CYP450 aracılığı ile dearilasyon sonucu doğrudan TCP ve dietiltiyofosfat'a (DEPT) dönüşür **(Şekil 2.4.)**. TCP metaboliti ise kendisi ya da konjuge formu (glukuronid ya da sülfat) şeklinde hızlıca idrarla atılır [40].

Klorpirifos'un, Klorpirifos-okson ve TCP (3,5,6-trikloro-2-pridinol) olmak üzere iki temel metaboliti vardır. TCP, Klorpirifos'tan daha az zehirli olup kolinesteraz baskılanmasına da neden olmaz [49]. Klorpirifos iki aşamalı bir yol ile detoksifiye edilir. Detoksifikasyon aşamaları ana bileşiğin oksona sitokrom P450 sistemi ile biyoaktivasyonu ve oluşan okson bileşiğinin esterazlar (karaciğer veya serum paraoksonazlar) ile hidrolizini içerir [49]. Klorpirifos-okson, asetilkolinesterazlara (AChE) yüksek afinite ile bağlanır ve aynı zamanda karboksil esteraz (CarbE), bütirilkolinesteraz (BChE) ve diğer kolinesterazlara (ChE) da yüksek afiniteyle bağlanan temel kısmı oluşturur [11].



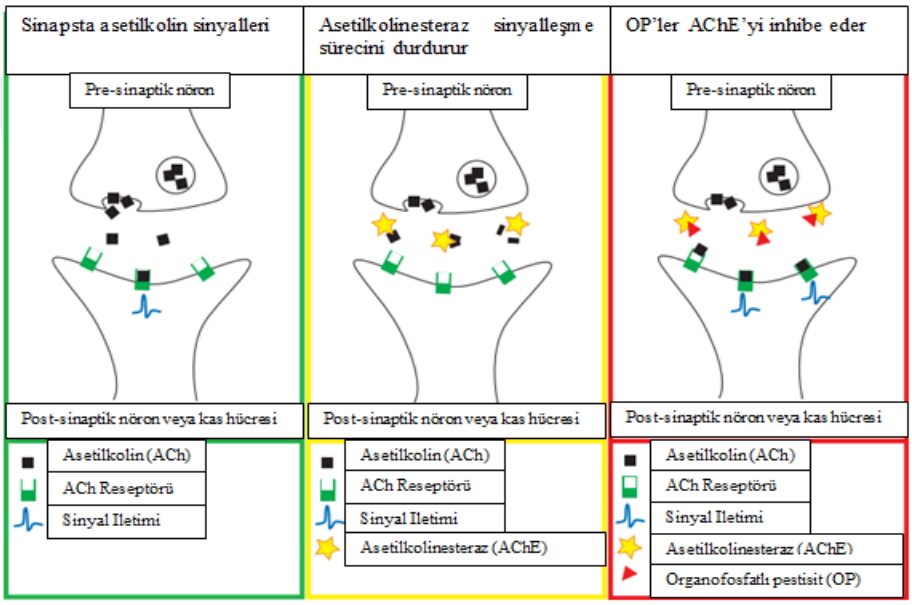
Şekil 2.4. Klorpirifos'un metabolizması [49].

Klorpirifos lipofilik bir yapıya sahiptir, hücre zarından sitoplazma içine kolayca geçer ve hücresel moleküllere hasar verir. Ayrıca klorpirifos, kan-beyin bariyerini de geçebilme özelliğine sahiptir [40]. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile oksidatif hasar başlar, membran lipidleri başta olmak üzere organizmadaki biyomolekülleri (lipid, protein, DNA) oksidatif hasara uğratır. Oksidatif stres sonucunda meydana gelen serbest radikaller hücre fosfolipidleri, protein, ve DNA dışında inorganik ve organik bileşiklerle de reaksiyona girebilme kabiliyetine sahiptir. Serbest radikallerin DNA'yı etkilemesi sonucu karsinojenik mutasyonlar oluşur. Serbest radikaller, hücreyi koruma özelliğinde olan nonenzimatik ve enzimatik antioksidan sistemlerinde azalmaya yol açarak, organizmanın farklı dokularında lipid peroksidasyonu artırırlar [43, 48].

2.5. Organofosfatlı Pestisitlerin Asetilkolin ve Asetilkolinesteraz Üzerine Etkisi

Asetilkolin, kas ve sinirlerin kesiştiği kavşaklarda, merkezi sinir sisteminin farklı yerlerinde ve iç organ motor sistemlerindeki lenf bezlerinde yer alan sinir hücresi ileticisidir. Asetilkolin ilk keşfedilen nörotransmitterlerden biridir. Nörotransmitterler ise, bir nöron ile başka bir hücre arasındaki ya da bir nöron ile başka bir nöron arasındaki iletişimleri sağlayan kimyasalardır. Asetilkolin elektriksel iletiyi bir nörondan başka bir nörona aktarır, asetilkolin nöronal olan ya da nöronal olmayan hücrelerden salınan asetilkolinesteraz ile inaktif olur. ACh, AChE enzimiyle asetik asite ve koline hızlı bir biçimde hidroliz olur [11, 52]. AChE, aktif bölgesini histidin, serin ve aspartik asit gibi üç önemli amino asitin karakterize ettiği hidrolaz ailesinden olan bir enzimdir. AChE; bazı kan hücrelerinde, kas ve sinir hücrelerinde sentezlenmektedir [52].

Organofosfatlar dokularda asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu ile dokularda asetilkolin birikmesine neden olurlar, bu durum ise sinir fonksiyonlarında hasara yol açar, nörotoksik etkiler oluşturur, geri dönüşümü olmayan zehirlenmeleri meydana getirir. Organofosfatlı bileşiklerin AChE enzimini inhibe etmesi sonucu sinaptik aralıkta asetilkolin (ACh) miktarı artar **(Şekil 2.5.)**. Klorpirifos, karaciğerde oksidatif desülfürasyona uğrayarak CPO'ya dönüşmesi ile AChE'yi inhibe etmiş olur. CPO, AChE'nin aktif bölgesine bağlandığı zaman, AChE'nin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi hidroksil grubu ile CPO'nun fosfat grubunun arasında kovalent bağ oluşur [44]. Organofosfatlar ile zehirlenmenin en temel ve en belirgin klinik etkileri AChE inhibisyonundan kaynaklanır [53].



Şekil 2.5. Organofosfatlı pestisitlerin Asetilkolinesteraz üzerine etkisi [11].

Klorpirifos ile yapılan bir çalışmada 8 hafta boyunca klorpirifos uygulanan sıçanların karaciğer enzimlerinde artış olduğu ve AChE enziminin inhibe olduğu fakat diyetle çinko verildiğinde AChE enziminin tekrar normale döndüğü belirtilmektedir [13].

Gültekin ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada Klorpirifos etil'in böbrek, akciğer ve beyin dokularında lipid peroksidasyonu artırdığını belirlemişlerdir. Lipid peroksidasyonunda artış, DNA hasarı ve protein değişikliklerinin gerçekleşmesi sonrasında; gap junction aracılıklı haberleşmede azalma, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda farklılıklar, pH'da değişiklikler, intraselüler kalsiyum değişiklikleri, hücre ölümü vb. hücresel fonksiyon bozukukları meydana gelir [48]. Organofosfatlı pestisitlerin yol açtığı oksidatif stres sonucu bu durumdan en çok etkilenen sistem antioksidan sistemdir [50].

2.5.1. Klorpirifos'un Sağlık Üzerinde Oluşturduğu Toksik Etkiler

Deri yoluyla temas şeklinde, ağız yoluyla sindirim ve solunum yoluyla etkili olan organofosfatlı bir insektisittir. Zararsız denilebilecek, günlük olarak alınabilecek miktarı ise 0,01 mg/kg'dır. Zararsız olan ve hedef dışı olan arılarda, kuşlarda, balıklarda, ipek böceğinde de toksik etki gösterebilmektedir [13, 36].

Organofosfatlı insektisitlerin sağlık üzerinde meydana getirdiği; baş ağrısı, mide bulantısı, baş dönmesi, kaslarda kasılma, terleme, diyare, tükürük salgısında artış, bilinç kaybı ve ölüm gibi etkiler klorpirifosta da görülmektedir [40].

Klorpirifos zehirlenmesinde, merkezi sinir sistemini etkileyen konvülziyon (nöbetler), konuşma bozukluğu, koma ve uykusuzluk gibi diğer belirtiler de görülebilir [44]. Klorpirifos'un solunum sistemine, kardiyovasküler sisteme, immün sisteme, üreme sistemine ve özellikle de sinir sistemine toksik etkileri vardır. Oral yol veya deri yolu ile dört ay boyunca düşük dozlarda Klorpirifos'a maruz bırakılan tavuklarda, kedilerde ve insanlarda gecikmiş nöropatinin oluştuğu bildirilmiştir [51].

Klorpirifos, insan ve hayvan hücrelerinde ROS üretimine yol açarak oksidatif strese neden olur ve normal hücrelerin gelişmelerini, farklılaşmalarını bozar. Klorpirifos ratların farklı organlarında lipid peroksidasyon ile oksidatif stres meydana getirir. [40]. Klorpirifos akut ve kronik olarak uygulanmaları ile; embriyotoksisite, immünotoksisite, genotoksisite, hepatotoksisite, teratojenite, hepatik disfonksiyon, nörokimyasal değişimler oluşmaktadır [11, 40]. Klorpirifos DNA'da hasara yol açar [43]

Joshi ve arkadaşları, erkek ratlara uyguladıkları Klorpirifos'un, testis dokusunda histolojik değişimler meydana getirdiğini, biyokimyasal parametrelerde ve sperm dinamiklerinde olumsuz durumlara yol açtığını tespit etmişlerdir [40].

Mansour ve Mossa, erkek ve dişi ratlara 28 gün boyunca klorpirifos uygulayarak, ratların karaciğer ve böbrek dokularında histopatolojik değişikliklerin olduğunu belirlemişlerdir. Karaciğerde merkez vende dilatasyon ve konjesyon, hepatositlerde dejenerasyon ve hepatositler arasında Kupffer hücre sayısında artış, portal alanda ödem ve portal alan çevresinde fibrosis, inflamatuar hücre infiltrasyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Böbreklerde ise; hemoraji, inflamatuar hücre infiltrasyonu ve tübül epitel hücrelerinde şişme olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca lipid peroksidasyonunda, ALT, AST, LDH, GGT, total protein, ürik asit ve kreatinde artış olduğunu, plazma SOD, GST ve AChE enzimlerinde ise azalış olduğunu tespit etmişlerdir [40].

Ambali ve arkadaşları, Klorpirifos'un anemiye neden olduğunu ve serbest radikallerin eritrosit membranında istenmeyen durumlara yol açtığını, eritrositlerde kırılganlık oluşturduğunu belirlemişlerdir [40]. Akhtar ve arkadaşları, klorpirifos uyguladıkları erkek ratlarda beyin, karaciğer, testis, epididimis ve adrenal bez dokularında histopatolojik değişiklikler olduğunu belirlemişlerdir [40]. Farag ve arkadaşları, gebe ratlara farklı dozlarda Klorpirifos uygulayarak yeni doğan etkilerini araştırmışlar ve yüksek dozda verilen Klorpirifos'un fetotoksik ve teratojenik etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir [40].

Goel ve arkadaşları, 13,5 mg/kg doz Klorpirifos'u 8 hafta boyunca ratlara uygulayarak kontrol grubuyla kıyaslamışlardır ve klorpirifos uygulanan ratlarda vücut ağırlığında azalma olduğunu tespit etmişlerdir [40]. Çetin ve arkadaşları, erkek tavşanlara farklı dozlarda Klorpirifos uygulamışlar ve sonuçta Klorpirifos'un tavşanların kalbinde fonksiyon bozukluğu oluşturduğunu belirlemişlerdir [40].

Yu ve arkadaşları, fare retina dokusunda comet analizi ile yaptıkları araştırmada Klorpirifos'un DNA hasarı oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca fare retina hücrelerinde apoptoz ile göz hasarı meydana getirdiği tespit edilmiştir [40, 42]. Slotkin ve arkadaşları, Klorpirifosa maruz kalan Gallus gallus domesticus türü üzerinde yaptıkları araştırmada doğumsal kusurlarda artış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Klorpirifos'un serebral korteksteki serotonin reseptörleri üzerinde zararlı etkilere yol açtığını gözlemlemişler [42].

Klorpirifos beyin gelişimini engelleyerek, korteks ve hipokampusta değişikliklere yol açmaktadır. Marable ve arkadaşları av köpeklerine farklı dozlarda Klorpirifos uygulamışlar ve uygulanan tüm dozlarda plazma, beyin ve periferal dokulardaki BChE'ın ve kırmızı kan hücrelerindeki AChE'nin inhibe olduğunu belirlemişlerdir [11, 42]. Klorpirifos 18.14 mg/kg dozlarda tavuklara uygulandığında, tavuklarda davranış bozukluklarına yol açtığı, lokomotor aktivitede azalmaya, titremeye, solunum güçlüğüne ve ölüme neden olduğu tespit edilmiştir [42].

2.6. Çinko

Çinko (Zn), yüzlerce enzimin, proteinin yapısında bulunan, vücutta bulunma miktarı açısından demirden sonra ikinci sırayı alan ve organizma için önemli olan bir esansiyel eser elementtir [11, 54]. Çinko'nun % 85'i vücutta kas ve kemik dokuda, % 11'i deri ve karaciğer dokusunda, % 4'lük kısmı ise diğer dokularda bulunur. İskelet kasında, saçta, deride ve kalpte

Zn konsantrasyonu genel olarak daha sabittir. Kemikte, plazmada, akciğerde ve testiste bulunan Zn konsantrasyonu ise diyetle vücuda alınmış olan Zn miktarı ile bağlantılıdır. [11].

Zn, moleküler etkileşimlerde karbonhidratlara ve proteinlere yapısal olarak destek sağlar ve nükleik asit sentezinde, protein ve lipid sentezinde görev alır. Zn, proteinlerin % 3-10 kadarına bağlı bulunmaktadır ve kofaktörü olan 300'e yakın enzim etkinliğinde görevi vardır. Zn, membranların bütünlüğünü koruyarak, iyon kanallarının stabilitesini sağlar. Gen ekspresyonu düzenlenmesi amacıyla en az 200 transkripsiyonun DNA ile bağlantısında gerekli bir elementtir. Zn'nin, tiroid, büyüme ve insülin hormonu gibi daha birçok hormon salınımında ve depolanması sırasında rolü vardır. Zn immün sistem regülasyonununda da rol alır. Zn'nin hücre içi ve hücreler arası haberleşmede; koku, tat ve görme duyularının oluşumunda aktif olarak rolü vardır. Hücrenin serbest radikallere karşı korunmasında, apoptozun engellenmesinde, hücre çoğalmasında, gen ekspresyonunda, membran onarımında ve hücresel homeostazın sağlanmasında görevlidir. Zn redoks tepkimelerine katılım göstermez ve organizma içinde kararlıdır [11, 54].

Zn, bağırsaklarda absorbe edilir ve absorbsiyonun %60'ı duodenumda, %30'u ileumda ve %10'u jejenumda emilir ve lümenden mukoza hücresine alındıktan sonra bir kısmı plazmaya transfer edilir, bir kısmı da intestinal mukoza hücresinde kalır. Zn'nin büyük bir kısmı, yüksek molekül ağırlıklı hem proteinlere (>75.000 dalton) bağlanır ya da düşük molekül ağırlıklı protein olan metallotionine bağlanır. Zn'nin intestinal hücrede mRNA regülatörü olduğu düşünülmektedir. Zn plazmada daha çok albümine bağlı olarak taşınır. Ayrıca, alfa2-makroglobulin, transferrin, serüloplazmin, haptoglobulin ve gamma globulin gibi diğer proteinlere de bağlanmaktadır. Histidin, glutamin, treonin, sistein ve lizin de az miktarda çinko bağlayabilir. Zn; %60 albümine, %10 transferrine, %30 ise sistein, histidin ve alfa2-makroglobulin vb. plazma bileşenlerine bağlanır. Oral ve parenteral uygulamalarda çinko büyük oranda karaciğerde ve vücuttan atılımı ise gastrointestinal yol ile olmaktadır. Feçes (günde 1-2 mg), idrar (300-700 g/24 saat) ya da ter yolu (1 mg/L) ile atılmaktadır [11, 55].

Kadmiyum (Cd), Zn ile fizikokimyasal etkileri bakımından benzerlik göstermesi nedeniyle Zn'nun absorbsiyonunu etkiler. Bakır (Cu), az miktarda alındığında Zn'de bir etki oluşturmaz ancak çok miktarda alınması durumunda Zn miktarında eksikliğe yol açar. Kalsiyum (Ca) alımının artması durumunda Zn absorbsiyonunun azaldığı ve Zn yetersizliğine bağlı semptomların meydana gelmesine neden olduğu yapılan araştırmalarda belirtilmiştir.

Böbrek iltihabında ve alkol kullanımına bağlı olarak karaciğerde meydana gelen hastalıklarda Zn'nin idrar ile atılımında artış ve serum Zn değerinde ise azalış olur. Besin türleri, ekolojik şartlar, genetik özellikler vb. faktörler serum Zn'nin düzeylerini etkileyebilir. Bu duruma örnek olarak, paratiroid hormonunun kemik dokudan ve üriner sistemden Zn atılımını artırması verilebilir [11].

Zn'nin homeostazını düzenleyen, gastrointestinal sistem epitel hücreleridir. Diyetle alınmış olan Zn miktarının %15 ile %30 arasında bir oranı absorbe edilmektedir. Diyetle alınmış olan Zn bağlama özelliğindeki ajanlar Zn'nin biyoyararlılığı üzerine etki ederler. Methionin, histidin vb. aminoasitlerin çinko emilimlerini artırdıkları bilinmektedir. Pirinçte, mısırda, baklagillerde ve tahıllarda var olan ve Zn ile birlikte kararlı bileşikler oluşturabilen fitat gibi organik olan maddeler ise Zn'nun biyoyararlılık durumunu inhibe ederler. D ve B6 vitamininin, D-penisilaminin ve prostaglandinin Zn emilimini artırdığı; toprağın, kalayın, oksalatın ve fosfatın ise çinko emilimlerini azalttığı bilinmektedir [54].

Zn'nin pek çok enzim yapısında ve fonksiyonunda yer aldığı bilinmektedir. Zn eksikliği genelde spesifik olmayan semptomlarda belirir. Zn eksikliğinin klinik açıdan tanısının konulabilmesi için plazma Zn düzeyinin 65 µg/dL seviyesi altında ve saç Zn düzeylerinin ise 70 µg/dL seviyesi altında bulunması gerekmektedir [11].

Zn eksikliğinde meydana gelen bulgular, kilo kaybı, iştahsızlık, çocuklarda büyüme geriliği, saç dökülmesi ve saç kırılması, yaraların geç iyileşmesi, tırnaklarda kırılma ve soyulma, kollajen biyosentezinde bozulmalar, gastrointestinal sistemde meydana gelen hastalıklardır. Ek olarak siroz benzeri karaciğer hastalıkları, kronikleşen böbrek hastalıkları, orak hücre anemileri, antikor oluşumunda azalma ve bağışıklık sisteminin yetersiz kalması, hücre aracılı immünitenin baskılanması, DNA'nın ve RNA'nın sentezlerinde azalmalar, tümör oluşumları, akut ve kronik infeksiyon oluşumu da eksiklik bulgularındandır. Zn eksikliğinin, testesteron seviyelerinde düşme, spermatogenez engellenmesi durumu, yumurta gelişiminde anormallikler, düşük vakalarının oluşması ya da ölü doğum vakaları, gebelik periyodunda uzama, doğum güçlüğü, gebelik toksemisi, preeklampsi ve teratogenesiste de etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca ACE aktivitesinde bozulma, LH ve FSH'nin sentezinde ve sekresyonunda bozulmalar, sinir iletiminde azalma ve ataksi meydana gelmesi olayları ile de ilgisi bulunmaktadır [11, 54].

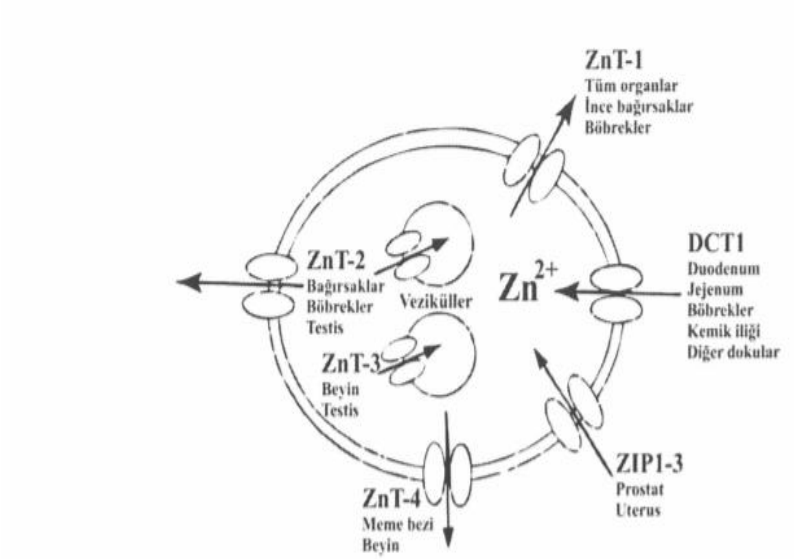
Zn eksikliğinin meydana gelmesi sonucu oksidatif stres oluşumu tetiklenebilir, lipid, protein ve DNA'da oksidatif hasarlar meydana gelebilir ya da apoptozun artışı gibi durumlar gerçekleşebilir [56].

Metallotionin, Zn bağlayıcı proteindir ve metallotioninin Zn'nin depolanmasında, dağılımında ve salınımında düzenleyici etkileri vardır. Zn'nin enterosit ve hepatositlerde fizyolojik koşullarda tutulumunu sağlar ve güçlü bir antioksidan etkiyi oksidatif stres etkisinde çinkoyu bırakarak meydana getirir [11]. Metallotioninler (MT), ağır metalleri bağlayıcılar ve sistein bakımından zengin olan küçük proteinler olup stres yanıtına katılırlar. Sülfür grupları içerirler ve hücreyi elektrofilik olan moleküllerin ve oksidanın etkilerine karşı korumaktadırlar. Metallotioninler içerdikleri tiyol grupları sayesinde antioksidan süreçlerde görev alırlar. Zn, Cu vb. eser elementler, metallotionin sayesinde depolanır ve hücrenin bölümlerine dağıtılırlar. Metallotioninler, enzimlerin, Zn – proteinlerin, Zn bağımlı transkripsiyon faktörlerinin biyosentezlerini düzenlemede görev alırlar. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin, iyonize olan radyasyonun, elektrofilik özellikte antikanser ilaçların, metallerin ve mutajenlerin meydana getirdiği toksik etkilerden dokuları korurlar ve ağır metalleri detoksifiye ederler [57].

MT, hem oksitlenmiş glutatyonlarla (GSSH) bağlamış olduğu Zn iyonlarını serbest bırakarak gerekli Zn'yi sağlar hem de çinko iyonlarına depo görevi yapar. Metallotionin'in hücrelerde yaptığı etki glutatyon ile eşdeğer olarak görülebilir [54].

Zn, canlılığın devam etmesinde, canlılığın çoğalmasında ve immün sistem faaliyetlerinin devamında gereklidir. Tüm biyolojik sistemler için, hücresel ve sistemik çinko dengesini kontrol altında tutma, hayati öneme sahiptir. Zn'nin dengede kalması ise çinko taşıyıcıların ve çinko bağlayıcı moleküllerin sayesinde olur. Hücresel Zn'nin çoğu yüksek bir afinite ile proteinlere, metallotioninler'e, sisteini, histidini ve difosfatı bulunduran diğer hücresel yapılara ve glutatyon'a (GSH) bağlıdır. Serbest hücresel çinko ise daha azdır. Absorblanan Zn, ince bağırsağın bazolateral membranından portal dolaşıma katılır ve buradan da metabolizmasında en etkin rolü alan karaciğere gider. Memelilerde Zn'nin hücre zarından taşınmasını sağlayan iki tane taşıyıcı protein vardır, bunlar ZnT (Zn taşıyıcı proteinler) ve ZIP (Zinc-Iron related transporter Protein / Zn-Fe ilişkili Taşıyıcı Protein) olarak adlandırılırlar. ZIP'ın 10 tane, ZnT'nin ise 14 üyesi vardır. Zn'nin organellere, hücre dışına ya da sekretuar vezikül ve granüllere taşınması ZnT ile olur. ZIP ise; Zn'nin hücre içine taşınımını sağlar ve sitozolik Zn miktarında ise artışa neden olur. ZnT5 ve ZnT1 hücre zarında yer almaktadır ve

ZnT5'in görevi hücre içi Zn miktarını artırmaktır, ZnT1'in görevi ise hücre içinde Zn oranını azaltmaktır. Bu taşıyıcılarda meydana gelen mutasyonların ya da fonksiyonel bozuklukların, hastalıkların ortaya çıkması ile ilgili olduğu bilinmektedir [11, 57].



Şekil 2.6. Çinko taşıyıcı ZnT 1-4 ailesinin öngörülen konumları ve doku özgünlükleri [58].

Zn farklı dokulara taşıyıcı özellikte proteinler aracılığıyla taşınır. ZIP-4 proteinleri sayesinde gastrointestinal sistemden Zn'nin absorbsiyonu sağlanır. ZnT-1 genellikle ince bağırsak hücrelerinde görev alır, ZnT-2 bağırsak, testis ve böbreklerde görev alır, ZnT-3 ise testislerde ve beyinde görevlidir **(Şekil 2.6.)** [54].

Farklı hücre ve dokularla ilgili yapılan çalışmalar, Zn eksikliğinin oksidatif stresle bağlantılı olduğunu ve Zn takviyesi ile oksidatif hasarın azaldığını göstermiştir. Zn, glutatyon metabolizması için önemli bir role sahiptir. Glutatyon'un yeterli olmayışının Zn eksikliği ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Zn proteinleri; serbest radikal üreten metallere, serbest radikallere, okside Glutatyon'a maruz kaldığında, içerdiği sülfür kümelerine bağlı halde olan Zn'yi bırakırlar, serbest olan Zn ise antioksidan sinyalini düzenleyici görev üstlenir [57]. Zn, süperoksit dismutaz'ın yapısında bulunarak, yeterli oranda metallotionin ile tutunarak ve tioller için koruyucu ajan olarak dokuları serbest radikal hasarından korur [54].

Zn miktarı genellikle diyet ile sağlanır. Vücutta Zn emilimini etkileyen birçok faktör mevcuttur. Diyetteki çinkonun konsantrasyonu ve gebelik, metabolik hastalıklar vb. gibi durumlar. Yetişkin bir birey için günlük çinko miktarı 8-11 mg/gün olacak şekilde tavsiye edilmiştir. Yetişkinlerde günlük olarak tolere edilebilecek en fazla miktar ise 40 mg'dır. Zn'nin biyolojik yarı ömrü yaklaşık olarak 280 gündür. Vücuda alınan çinko; saçta,

karaciğerde, kemiklerde, böbrekte, prostatta, pankreasta ve dalakta farklı oranlarda birikmektedir [54, 59].

Zengin çinko içeriği bakımından, et (kırmızı et, tavuk, hindi), yumurta, sebzeler (ıspanak, pazı, bamya, bezelye, roka, mantar, patates), baklagiller (fasulye, nohut), deniz ürünleri (istiridye), kuruyemişler (kabak çekirdeği, kaju, yer fıstığı, antep fıstığı, badem, fındık, ceviz), mısır, buğday, arpa, yulaf, çavdar, pirinç, kepek, soya fasulyesi, süt ürünleri (yoğurt, beyaz peynir) örnekleri verilebilir [58, 59, 60, 61].

Yapılan araştırmalar çinko ile kahve, çay, çikolata ve şarap gibi gıdalarda bulunan, bitkilerde tat ve kokudan sorumlu polifenollerde var olan, hidrokinon grubu bileşenin birlikte alınması durumunda süperoksite yönelik koruma sağlayabileceği tespit edilmiştir. [62].

Goel ve arkadaşları, ratlara klorpirifos uygulayarak çinkonun koruyucu rolünü araştırmışlardır. Klorpirifos uygulandıktan sonra vücutta oksidatif stres artmış ve antioksidan enzim değerlerinde ise değişiklikler olmuştur. Klorpirifos uygulanan ratlara çinko verilmesinden sonra lipid peroksidasyonun normal değerlere geldiğini belirlemişlerdir. Klorpirifos'a maruziyet karaciğer enzimlerini etkilemektedir. Zn'nin karaciğer histolojik yapısını koruduğu anlaşılmıştır [63].

Mediha Sefi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Zn'nin farelerde maneb kaynaklı renal oksidatif hasara karşı faydalı olabileceği belirtilmiştir. Zn'nin plazma kreatin, üre, ürik asit ve laktat dehidrojenaz seviyelerini düşürerek böbrek biyobelirteçlerinin değişikliklerini hafifletebildiği belirtilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, ROS üreten ksenobiyotiklere maruz kalma ile ilişkili, böbrekler de dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlarda oksidatif hasara karşı korumada Zn etkinliğini doğrulamıştır. Bu etki Zn'nin antioksidan kapasitesi ile ilgilidir. Zn ayrıca süperoksit anyon radikalini daha az zararlı türlere dönüştüren bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD) kofaktörüdür [64].

2.7. Tanenler ve Tannik Asit

Tanenler; molekül ağırlıkları 500 - 30.000 Da (Dalton) arasında olabilen, bitkilerde doğal olarak bulunan polifenollerdir. Tanen terimi ilk kez, deri ve boya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasından dolayı hayvan derilerini tabaklamada ortaya çıkmıştır [65, 66].

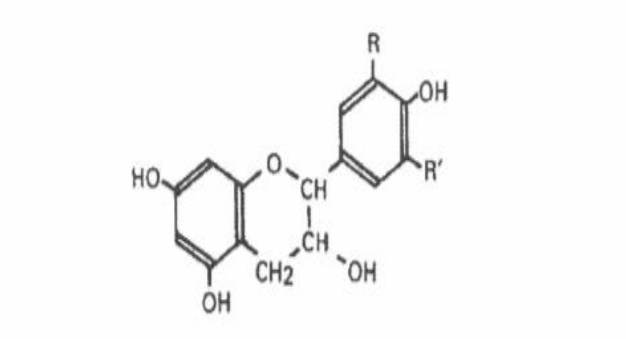
Tanenler tahıllarda, baklagillerde, sebzelerde ve meyvelerde özellikle tahıl tanelerinde, baklagil tohumlarında, kestanede, meşe palamudunda, sumak ve sorgum gibi bitkilerde çok

miktarda bulunur. Tanenler, bitkilerin odun, kabuk, meyve, yaprak, meyve tohumu, kök vb. farklı kısımlarında ve bitkilerin özünde var olurlar, ayrıca bu kısımlarda gelişimlerin düzenlenmesine de katkı sağlarlar. Tohum kabuğunda bulunan tanen miktarı, tohumda bulunan miktardan 10 kat daha fazladır. Tanenler acı ve buruk olan bir tada sahiptirler ve bitkisel gıdalarda değişen konsantrasyonlarda bulunurken yeşil çay ve kırmızı şarapda nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunur [66, 67]. Bazı bitkiler içerdikleri tanenler yönünden zengindir. Bitkilerde bulunan tanenlerin miktarları; bitkilerin türlerine göre, vejetasyon dönemlerine göre, bitkinin farklı bölgelerine göre (tohum, filiz, yaprak, kabuk vb.) değişebilir, ayrıca bitkinin bulunduğu bölge ve iklime bağlı olarak da değişir [58]. Bitkilerin büyüme dönemlerinde tanenler kendilerini kahverengi ve kırmızımsı renklerle belli ederler [65].

Tanenler hidrolize olan ve hidrolize olmayan (kondanse) tanenler şeklinde iki gruba ayrılmaktadır [58].

- Hidrolize Olabilen Tanenler: Merkezde fenolik gruplar ve karbonhidratla esterleşmiş olan hidroksil gruplarını içermektedirler. Zayıf asitler ve bazlar, sıcak su, gastrointestinal esterazlar ile bakteriler, mayalar ve mantarlar tarafından salgılanan enzimler ile hidrolize olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi suda çözünebilen bileşikler verirler. Bu grubun en önemli temsilcisi tannik asittir. Hidrolize olabilen tanenler; alkolde, asetonda, gliserolde ve suda çözünme özelliğine sahiptirler ancak benzen, etil eter ve kloroformda çözünemezler. Hidrolize olabilen tanenler, hidroliz ürünlerine göre; gallo tanenler, ellajik tanenler ve kompleks tanenler olarak gruplara ayrılırlar [58, 66].

- Hidrolize Olmayan (kondanse) Tanenler: Flavonlar olarak da adlandırılan kondanse tanenler; hidrolizle parçalanmaya dayanıklı flavonoid ünitelerin oligomer ya da polimerleridir. Vücutta enzimatik olarak parçalanma özellikleri yoktur ya da hidrolitik ajanlarla muamele edilme sonucu parçalanmazlar. Sadece çok şiddetli alkali özellikte ve asit bir ortamda antosiyanidinlere ve kateşine parçalanırlar **(Şekil 2.7.)** [58].



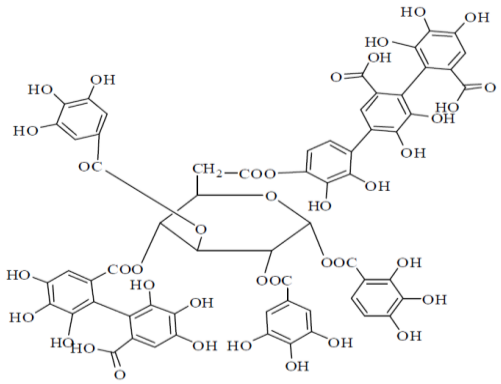
Şekil 2.7. Kondanse tanenlerin molekül yapısı [58].

Hidrolize olan tanenler bitkilerde daha düşük miktarda bulunur. Kondense tanenler; meyvelerde, otlarda, tahıllarda, baklagillerde daha çok bulunurlar. Bitkilerde, kuru ağırlığın %5 ile %50 arası kadar tanen bulunmaktadır. Tanenlerin daha fazla miktarda bulundukları bitkiler ise, çift çenekli bitkiler ve baklagiller olup, tahıllarda ve baklagillerde bulunan tanen miktarı %2 ile %4 arasındadır [66].

Tannik asit, hidrolize tanen olup; kakao, yeşil çay, çay, nohut, fasulye, bezelye, bakla, börülce, mercimek, üzüm, çilek, kahve, fındık, ceviz, elma, muz, böğürtlen, sumak, kızılcık, hurma, alıç, şeftali, armut, erik, ahududu ve bitkilerin çoğunda bulunmaktadır. Şarap ve çayda fenolik bileşikleri bulunmaktadır. 70 kg ağırlığındaki bir kişinin gıdalarla alabileceği tannik asit miktarı günde yaklaşık 400 mg olarak belirtilmiştir [58, 65, 68]. Isıl işlemler, kurutma işlemi, ıslatma işlemi, öğütme işlemleri ve peletleme uygulamaları yem hammaddelerinde bulunan tanenlerin miktarını azaltabilmektedir. Fasulye'ye ısıl işlem uygulanmış çalışmalarda, tanen miktarında %55 ile %71 arasında azalma meydana gelmiştir [66].

2.7.1. Tannik Asit Yapısı

Tannik asit; doğaldır, zehirsizdir, suda çözülebilme özelliği vardır, yaklaşık 1701,20 Da molekül ağırlığına sahiptir. Merkezde glukoza bağlı beş gallik asit bulunur ve diğer beş gallik asidin de bunlara ester bağı ile bağlı olduğu hidroliz edilebilme özelliğine sahip tanninin bir formudur. Çözünebilir tanene en iyi örnek olarak tannik asit verilebilir. Bu asit kendiliğinden ya da enzimatik olarak gallik asite ve glikoza ayrışır. Bu gruptaki diğer tanenler hidrolize oldukları zaman gallik asitin yerine elajik asit oluşur [66].



Şekil 2.8. Tannik asit yapısı [68].

Bazik şartlar altında ve oda sıcaklığında tannik asit; indirgeyici ve stabilleştirici özellikte, çevre dostu olan bir ajan olarak kullanılır. Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından Tannik asit'in, güvenilir kimyasal olduğu bildirilmiş ve gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir [69,70,71].

Tannik asitteki molekül yapıda bulunan polifenolik özellikte gruplar, bazik koşullarda havadaki oksijenle aktif kinon gruplarına kolayca oksitlenebilirler. Bazik koşullarda kararlı çapraz bağlı ağ oluşumu sayesinde bu gruplar ile biyomoleküllerin yapısında bulunan primer amin grupları tepkimeye girerek kovalent bağları oluşturabilirler [72,73]. Tannik asit, amino asit prolin ile yüksek bir bağlanma afinitesine sahiptir, ancak potansiyel olarak herhangi bir amino asit üzerinde de hidroksil, asidik veya bazik fonksiyonel gruplarla hidrojen bağları oluşturabilir [74,75].

2.7.2. Tanenler'in Biyolojik Etkileri

Polifenol çeşitliliği arasında, tannik asidin geleneksel tıpta kullanımı, zehirli maddelerin detoksifiye edilmesinden, bitkisel tıbbın terapötik gücünün gösterilmesine kadar uzayan geniş bir yelpazede nesiller öncesine dayanmaktadır [73, 76]. Tannik asit, derinin, demir mazı mürekkebinin, kırmızı şarapların bitkisel tabaklanmasında ve çeşitli hastalıkları tedavi etmede kullanılan geleneksel bir ilaç olarak önemli bir bileşendir. Bitki kaynaklı polifenolik fitokimyasallar beslenme çeşitliliği içerisinde her yerde bulunabilir ve geniş bir kullanım alanına sahiptir [77,78,79]. Mevcut araştırmalar, tannik asitin antikanserojen, antimikrobiyal, antimutajenik, antienflamatuar, antiallerjik ve antioksidan etkinliğe sahip olduğu ve kanamayı durdurabilme özelliğine sahip olduğu göstermiştir. Ayrıca tannik asitin antiviral ve antifungal aktiviteleri de mevcuttur [80, 81, 82, 83].

Tanenler; sağlık alanında büzüştürücü, hemostatik, antiseptik, yatıştırıcı, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici, ateş düşürücü, peklik yapıcı, antiromatizmal gibi etkilere sahiptir. Tanenler'in, bakır, kurşun ve alkaloid zehirlenmelerinde antidot olarak kullanıldığı bilinmektedir. Tanenler'in sağlık alanı dışında kullanımı da oldukça yaygındır. Tanenler, şarap ve biranın berraklaştırılmasında, ayrıca deri ve boya endüstrisinde sıklıkla kullanılırlar [58, 65, 66].

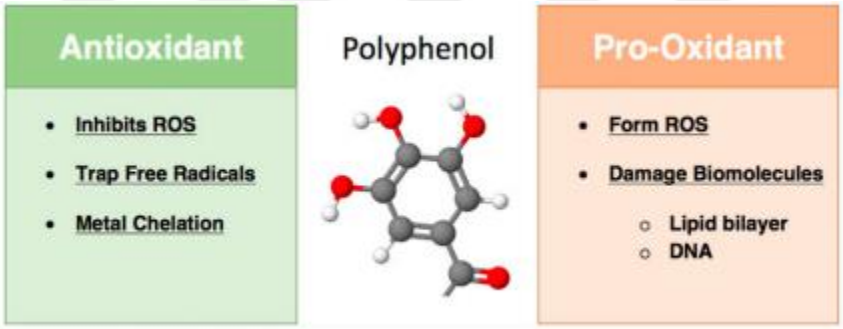
Tanenler beyaz kil ve nişasta ile birlikte karışım halinde ya da tek başına pomat halinde deri hastalıkları için kullanılmıştır. Ayrıca, ağız yoluyla alınan hapları, tozları, jelatin kapsülleri ve çözeltilerinin organların kanamalarını engelleme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir [65].

Tanenler'in antimikrobiyal etkileri, enzim ya da substratlar ile kompleks oluşturmaları ve mikrobiyal özellikteki enzimleri inhibe etmelerine, mikroorganizmanın membranların üzerinde oluşturduğu toksik etkiye ve metal iyonları ile oluşturdukları kompleksin toksik etkileri artırmasıyla ilişkilendirilmektedir. Tannik asit'in; Clostridium perfringens, Bacteriodes fragilis, Enterobacter cloacae, Escherichia coli vb. bağırsakta oluşabilecek mikroorganizmaların gelişimlerini, demirin mikroorganizmalarca kullanılabilirliğine engel olarak, demir ile şelasyon meydana getirerek inhibe ettiği belirlenmiştir [65,73]. Tanenler enzimlere bağlanarak protein ve nişasta sindiriminde aksamalara neden olmaktadırlar. Ayrıca B vitaminleri ve demir ile kompleks oluşturma sonucu B vitaminlerinin ve demirin emilimini azaltırlar [65]. Belirli konsantrasyonlarda TA, hemoroid ve ishal gibi gastrointestinal rahatsızlıkları, ciddi yanıkları tedavi etmek ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlamak için kullanılabilir [73].

Tanenler karbonhidratları, proteinleri, B_{12} vitaminini, kalsiyum ve demir gibi mineralleri çöktürüp, bağlayabilir. Proteinlere olan eğilimleri karbonhidratlara kıyasla daha fazladır. Tanenler'in proteinlere bağlanarak meydana getirdikleri yapıların pH değeri 3,5 ile 7,0 arasında sabittir. Ayrıca tanenler, proteinlerden daha düşük düzeyde polisakkaritlere ve metal iyonlarına da bağlanarak kompleks yapılar oluşturabilmektedir [58].

Kondanse ve hidrolize tanenlerin içinde bulunduğu, polifenol bakımından zengin olan meyveleri, sebzeleri ve çayı tüketmenin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir [65, 68, 84].

TA ve diğer tanenler gibi polifenoller, çoğu zaman sağlığa yararlı olarak ifade edilen birçok bitki bazlı gıdada bulunan ve antioksidan aktivitelerinden dolayı zararlı inflamasyonu azaltan geniş bir molekül grubunun sınıflandırmasıdır [85, 86]. Polifenollerin antioksidan özellikleri olup, radikal temizleyici aktiviteleri vardır. Oksidatif stres, hücrelerin normal redoks durumundaki dengesizliğin bir sonucu olarak, hücresel bileşenlere, özellikle proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksik etkisidir. Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, oksidatif metabolizmanın bir yan ürünü olarak üretilir ve reaktif oksijen türleri, normal hücresel aktiviteyi bozan, inflamasyonu ve doku ölümünü tetikleyen oksidasyon zincir reaksiyonlarını tetikleyebilir. Genel olarak biyoaktif antioksidanlar, oksidatif stresi hafifletmeye, zararlı etkilerini yok etmeye ve kararsız oksijen radikallerinin aktivitesini engellemeye yardımcı olan yapılar olarak ifade edilirler [87, 88].



Şekil 2.9. Tanenlerin antioksidan ve prooksidan özellikleri [85].

İçeriğinde tanen bulunan polifenollerin; lipid peroksidasyon inhibisyonu, antitümöral, antiviral, plazmin aktivitesi, antiHIV vb. çeşitli biyolojik özellikteki aktiviteleri bulunur. Tanenler, fenolik bileşiklerden olup, serbest radikali kabul edici gibi davranıp oksidasyonun oluşumunu daha başlama aşamasındayken engellerler. Çok iyi hidrojen verici olmaları sebebiyle fenolik bileşikler, antioksidan özelliktedirler [85, 89]. Sebzelerde ve meyvelerde var olan fenolik bileşiklerdeki antioksidan etkileri, redoks özelliklerine sahip olmalarından ve hidrojen vericisi olma özelliklerinden dolayıdır. Çayda bulunan fenolik bileşikler, lipid peroksidasyonu önler, antioksidan etki göstererek serbest radikallerin oluşturabileceği olumsuz etkileri yok ederler [90].

Tannik asitin oksidan ve antioksidan mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Tannik asit, hem geçiş metallerinin varlığında DNA hasarını indükleyerek bir prooksidan olarak hem de baskılayıcı hidroksil radikal üretimi ile antioksidan olarak işlev

görebilmektedir [91, 92]. Tannik asitin hidroksil radikal oluşumuna karşı bir antioksidan olarak hareket ettiği ve yüksek süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit süpürücüye sahip olduğu bilinmektedir. Ancak aynı zamanda bir prooksidan olarak hareket ettiği, en belirgin olarak kromatindeki bakır iyonlarını bağladığı ve DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir [93-96]. Güçlü indirgeyici antioksidanlar, özellikle Tannik asit proteinlere ve diyetteki metal iyonlarına bağlanarak antibesin etkisine sahip olabilir ve sindirim sırasında emilimini önleyebilir [86, 97-100].

Polifenoller, yaşam boyu kanser riskini azaltan diyet antioksidanları olarak ün kazanmıştır. Meyve ve sebzelerden günlük polifenol alımı genellikle faydalı olarak kabul edilirken, mevcut araştırmalar, belirli polifenollerin tek başına veya kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde hücresel düzeyde güçlü antikanser aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Bu antikanser özgüllüğünün kesin mekanizması bilinmemektedir. Polifenollerin antioksidan özellikleri, kanserle ilişkili gen ekspresyonu, kanser hücresi sinyalizasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesindeki değişiklikleri içeren özellikleri antikanser aktivitesini açıklamak için kullanılan yollardandır [101]. Tannik asit, elektrostatik etkileşim kurabilme yeteneği, hidrojen bağı kurabilme özelliği ve hidrofobik etkiler oluşturması sebebiyle jelatin, kolajen, albumin vb. biyomakromoleküllerle direkt etkileşime girebilmektedir [69,102].

Bununla birlikte, tannik asit gibi birçok hidroksil grubuna sahip polifenoller, metal iyonlarını şelatlama yeteneğine sahiptir. Bakır iyonları kromatinde bulunur ve çeşitli kanser tümörlerinde yüksek hücresel bakır seviyeleri görülür. Serbest bakır iyonları redoks aktiftir ve yüksek bir DNA bağlanma afinitesine sahiptir. Tannik asit kanser hücrelerinde bakır kompleksleri oluşturarak ROS oluşturabilir ve spesifik olarak DNA'yı bağlayıp bozarak hücre ölümünü gerçekleştirebilir [103].

2.8. Hücre Canlılığı Analizleri

2.8.1. MTT Canlılık Analizi

MTT, farklı ajanların hücrelerin canlılığına olan etkisinin incelenmesinde ve değerlendirilmesinde çok yaygın bir biçimde kullanılan yöntemlerden biridir.

Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık deneyleri arasında, MTT analizi yine en çok yönlü ve popüler tahlillerden biridir.

MTT tahlili, suda çözünür sarı boya MTT'nin [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülmesini içerir. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenir. Sonuç, kuyu başına ~10^6 hücreye kadar mükemmel doğrusallığa sahip hassas bir tahlildir. Metabolik aktivitedeki küçük değişiklikler MTT'de büyük değişikliklere neden olabilir. Bu durum doğrudan hücre ölümü olmadan toksik bir maddeye maruz kalındığında hücre stresinin tespit edilmesine olanak tanır. Tahlil, birden fazla kuyuda büyütülen yapışık veya yapışmayan hücreler için standardize edilmiştir. Protokolde, standart bir 96 oyuklu plaka kullanır ve plaka içinde oyuk başına 500-10.000 hücre ekilir. Test, 10^6 hücreye kadar güçlü bir doğruluk oranına sahiptir [104].

MTT yönteminin avantajları; hücrenin metabolik aktivitesinin sayısal bir şekilde saptanabilmesi, mikroplaka kullanımı ile örnek miktarının en aza düşürülmesi, aynı anda çok sayıda örneğin incelenmesine olanak tanıması ve diğer yöntemlere göre ekonomik olmasıdır. Bu özelliklerin yanı sıra MTT yöntemi canlı hücrelerin gelişme dinamiğine ve hücre miktarına bağlı olarak hassas ve hızlı analiz imkanı sunar [105].

2.8.2. xCELLigence Analizi

xCELLigence, elektriksel empedans teknolojisi sayesinde hücrelerin elektrodlara bağlanıp bağlanmamasına bağlı olarak ölçüm yapan, hücre bazlı olan mikroelektronik biyosensör sisteminden oluşur. xCELLigence, mikroelektronik hücre sensörü dizisinden oluşmaktadır. Bu sensör sayesinde elektronik empedansın ölçülmesini, elektrotlar üzerinde var olan değişikliklerin tespit edilmesini ve değişikliklerin izlenme olanağını sağlar.

Hücre indeksi (cell index) elektrik empedansındaki değişikliklerin ölçülmesi amacıyla kullanılır. Hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi elektrod empedansını etkilemektedir. Hücre indeksinin artışı ve azalışına bağlı olarak elde edilen veriler yazılım ile değerlendirilir.

xCELLigence yöntemi ile hücre proliferasyonu yani hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı, sitotoksisite yani canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranı belirlenebilir. xCELLigence yöntemi hücre karakterizasyonu hakkında bilgi verir [106, 107].

3. YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasallar

Fetal Bovine Serum Advanced (CAPRICORN SCI)

Trypsin-EDTA (WISENT MULTICELL)

Penicillin-Streptomycin (WISENT MULTICELL)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (WISENT MULTICELL)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (WISENT MULTICELL)

Dimetyhl Sulfoxide (DMSO) (NEOFROXX)

Klorpirifos-etil (Safban 25 WP) (Safa Tarım A.Ş.)

Tannik Asit, 500 gr (TEKKIM)

Çinko Oksit (Aldrich) (Katalog No:544906)

HEK293 hücre hattı

MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit] (Thermo Fisher) (Katalog No:M6494)

Sarf Malzemeler:

Santrifüj Tüpü (steril falkon tüp) (15 ml)(NEST)

Santrifüj Tüpü (steril falkon tüp) (50 ml)(NEST)

Hücre Kültürü Flask (25 cm^2) (NEST)

Hücre Kültürü Flask (75 cm^2)(NEST)

96'lık Hücre Kültürü Plate (NEST)

Kriyotüp (2 ml) ((NEST)

Thoma Lamı (CE)

Ependorf saklama kabı (NEST)

Ependorf (1,5 ml) (CAPP)

Steril Şırınga filtresi (0.22 μm) (ISOLAB)

Serelojik Pipet (10 ml) (NEST)

Otomatik Pipet (AXYGEN)

Otomatik pipet ucu (NEST) (1000 μl)

Otomatik pipet ucu (NEST) (200 μl)

Pipet ucu kutusu (1000 μl için) (NEST)

3.1.2. Cihazlar

xCELLigence (Roche) (RTCA DP- ACEA)

Mikroplate okuyucu (Epoch™ BioTek)

Laminer Akım Kabini (Telstar- Bio II Advance-CLASS II CABİNET EN-12469-2000)

Işık Mikroskobu (Leica)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 320R)

Vorteks (Vortex Mixer Vm-20)

CO_2 İnkübatörü (Panasonic MCO-170AIC)

CO_2 İnkübatörü (Memmert)

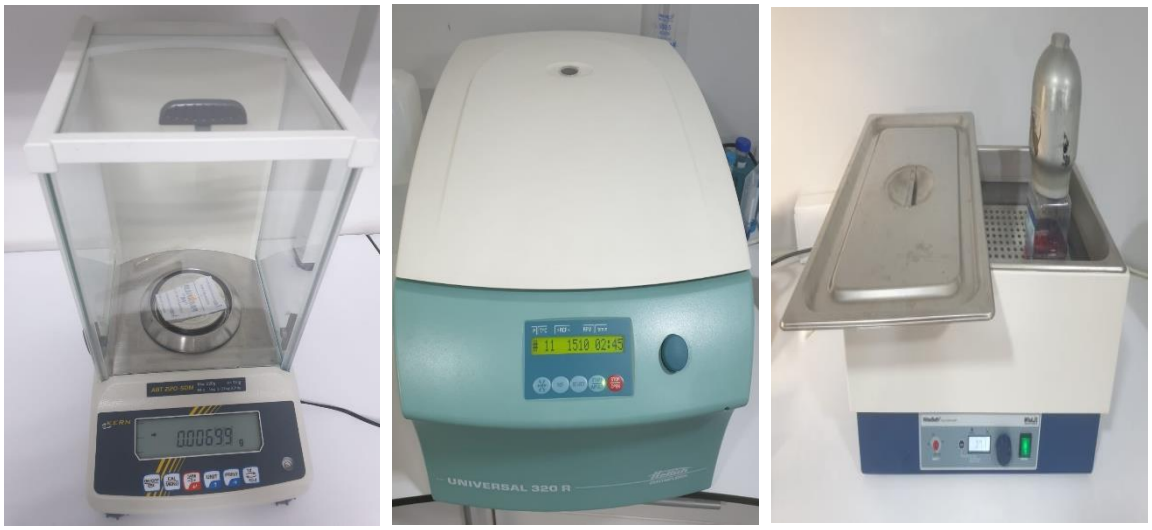
Hassas terazi (KERN ABT 220- 5DM)

Derin Dondurucu (-80°C Rua Instruments)

Sıvı azot tankı (Taylor- WHARTON LS4800)

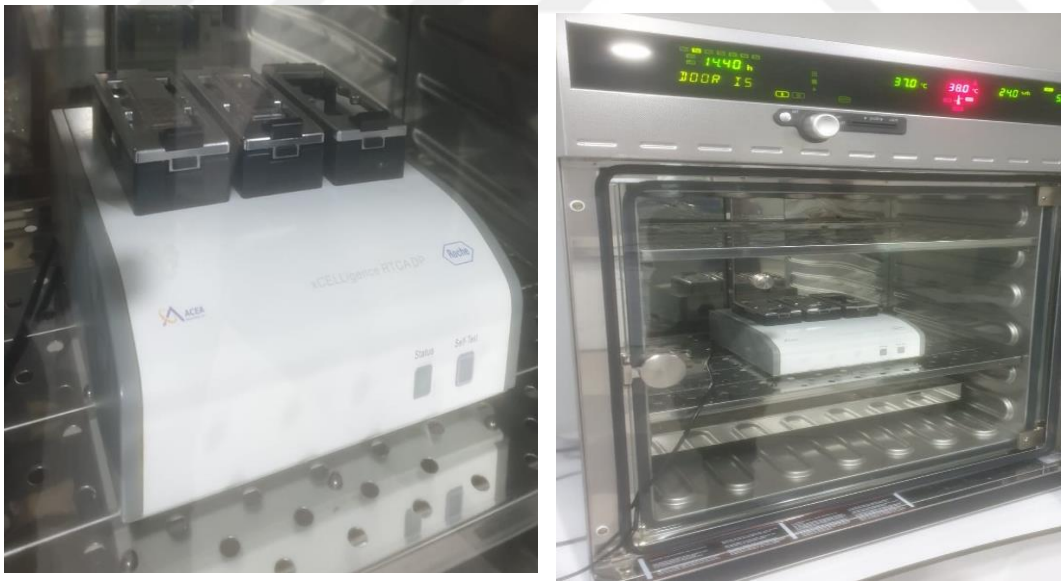
Su banyosu (Wisd - WiseBath)

Otoklav (Nüve Steam A- OT 40L)



(a) (b) (c)

Şekil 3.1. Hassas Terazi (a), Soğutmalı Santrifüj Cihazı (b) ve Su Banyosu (c)



(a) (b)

Şekil 3.2. xCELLigence Cihazı (a) ve Ölçüm Aşaması (b)



(a) (b)

Şekil 3.3. CO_2 İnkübatörü (a) ve İnkübe edilen hücreler (b)

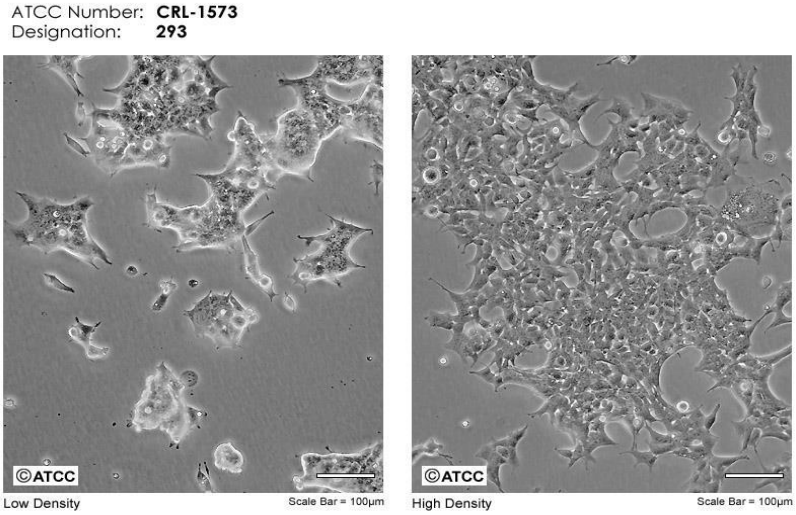
3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Klorprifos, çinko ve tannik asitin etkilerini HEK293 hücre hattında araştırmak için çalışma grupları oluşturulmuştur. Bu gruplar; standart hücre kültürü ortamında (37 ^{0}C ve %5 CO_2) inkübe edilen grup kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Deneysel gruplar ise, 10, 30, 60 ve 90 µg/mL klorpirifos eklenerek hazırlanan klorpirifos grubu ile 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit eklenerek hazırlanan tannik asit ve 25, 50, 75, 100 ve 150 µM çinko oksit (ZnO) eklenerek hazırlanan çinko gruplarıdır [13, 54, 59, 67, 77].

3.2.2. Hücre Kültürü

Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında gerçekleştirdiğimiz deneysel çalışmalarımızda Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection - ATCC® CRL1573™) temin edilen insan embriyonik böbrek hücreleri (Human Kidney Embriyonic Cells - HEK293) kullanıldı.



Şekil 3.4. HEK293 hücreleri [13].

Hücreler soğuk zincir ile teslim alındı ve çoğaltılmadan önce -196°C'de sıvı azot tankında muhafaza edildi. Hücreler %10 ısı ile inaktive edilmiş sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik içerecek biçimde hazırlanarak, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ortamında, inkübe edildi. Karbondioksit inkübatörü dekontamine edildi, inkübatör 37°C'de %5 CO_2 içerecek ve %97 nemli hava içerecek şekilde standart kültür ortamı ayarlarına getirildi. Çalışmada kullanılacak materyaller çalışmaya başlamadan önce otoklavlandı ve 175°C'lik etüvde sterilize edildi. Laminar akım kabininin içi ve laboratuvarda kullanılan tüm yüzeyler %70'lik etil alkol ile temizlendi. Ayrıca her çalışma öncesinde hücre kültürü laboratuvarı ve laminar akım kabini 15 dakika süresince ultraviole ışık (UV) ile sterilize edildi. Hücreleri pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin içerisinde bulundukları besiyeri 3-4 günde bir yenilendi ve hücreleri pasajlama işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. Laminar Akım Kabini

3.2.2.1. ***Hücrelerin Çözdürülmesi***

Hücreler deneysel çalışmada kullanılmak amacıyla -196°C'deki sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C'de su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüpler su banyosundan alınarak kurulandı ve alkolle silindikten sonra laminar akım kabinine aktarıldı. 9 mL taze besiyeri içeren falkon tüp içerisine, kriyotüpte çözdürülen hücre çözeltisinden 1 mL eklenip pipetaj yapıldı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Çöken hücreler üzerine 4 mL kadar taze besiyeri eklendi ve süspansiyon haline gelene kadar pipetaj yapıldı. Hücre kültür flasklarına 1 ml süspansiyon ve 9 mL besiyer konularak toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı. Flasklar 37ºC' ye ayarlı % 5 CO_2'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.2. ***Hücrelerin Pasaj İşlemi***

Flasklarda bulunan hücreler 3-4 günde bir ters mikroskop ile kontrol edildi. Hücreler bulundukları flaskın yüzeyini %80 yoğunlukta kapladığında laminar akım kabini içerisinde pasajlama yapıldı.

Adherent (yapışma) özelliğe sahip olan hücrelerin yapıştıkları kültür kabı zemininden kaldırılması :

- HEK293 hücrelerinin çoğaltıldığı flask içindeki medium, steril pipetler ile boş bir kaba aktarıldı.
- Medium atığından arınmış, içerisinde sadece yapışık hücrelerin bulunduğu 10 mL besiyeri (%89 DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin) eklendi.
- Hücrelerin yapıştıkları flask zemininden kaldırılması için flask yüzeyinin tamamı hücre kazıyıcı ile bir köşeden başlanarak diğer uca kadar yavaş yavaş kazındı.
- Hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüpe aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda falkon üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı ve falkona yaklaşık 4 cc besiyeri ilave edildi.
- Hücrelerin birbirinden tamamen ayrılması için steril pipet ile 25-30 kez pipetaj yapıldı ve bu esnada köpük oluşturmamaya özen gösterildi.
- Bu süspansiyondan 1'er mL alınarak hücre kültür flasklarına konuldu üzerlerine 9'ar mL taze besiyeri eklendi.

- Hücrelerin homojen bir şekilde dağılımını sağlamak için kültür flaskları yavaşça hareket ettirildikten sonra hücreler 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

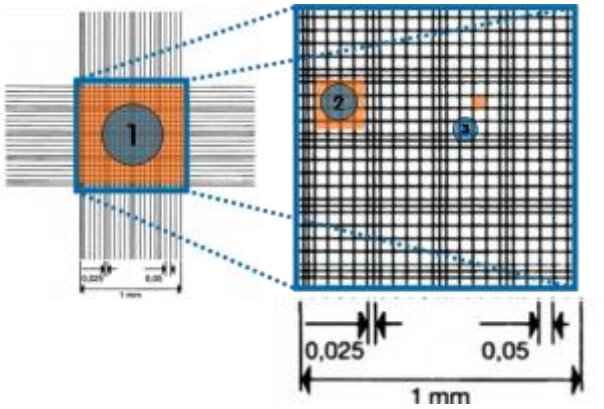
3.2.2.3. ***Hücrelerin Dondurularak Saklanması***

Santrifüj sonrası hücre peletinin üzerindeki sıvı atılarak yeni besiyerine konulup pipetaj yapıldı. Hücreler soğuğa dayanıklı olan kriyotüplere aktarıldı. Soğuğa dayanıklı olan kriyotüplere 1000 µL hücre süspansiyonu, 1000 µL besiyeri ve 100 µL %10 DMSO eklendikten sonra hücreler önce -20°C'de 1-2 saat ve daha sonra -80°C'de 24 saat bekletildi. Ardından sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirilerek ileride kullanmak üzere muhafaza edildi.

3.2.2.4. ***Hücre Sayısı ve Canlılığının Belirlenmesi***

Hücre sayımı için kalın düz sayım odacıklı lamın üzerine lamel konması temeline dayanan hemositometre yöntemi kullanıldı. Hızlı ve rutin hücre sayımı için yaygın olarak kullanılan hemositometre, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 9 büyük kareden oluşan yivlerin yer aldığı özel mikroskop lamıdır. 'Thoma" Lamı, "Neubauer" Lamı ve "Burker" Lamı olarak buluş sahiplerinin isimleriyle adlandırılır. Hücre süspansiyonları lam lamel arasına doldurulduğu zaman hücreler mikroskop altında gözlenir ve seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır. Bu sayımdan süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Thoma lamında 1 büyük kare, 16 orta boy kare, her orta boy karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde hesaplanır **(Şekil 3.6.)**.

- Derinlik boyutu, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup, 1/10 = 0,1 mm dir.
- 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = 0,05 mm x 0,05 mm x 0,1 mm = 0,00025 mm^3 = 1/4.000 mm^3'tür.
- Bir sayım alanında 16 x 25 = 400 küçük kare olduğundan toplam sayım hacmi = 0,00025 mm^3 x 400 = 0,1 mm^3'tür.



Şekil 3.6. Thoma lamı [108].

Thoma lamında sayım sonucu A x SF x16 x 10.000 formülü ile hesaplandı:

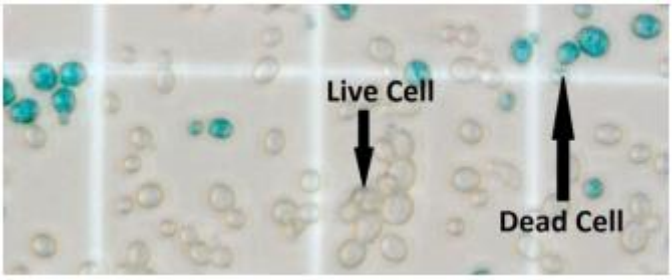
- A : Bir orta boy karede sayılan hücre adedi
- SF : Seyreltme faktörü
- 16 : 16 adet orta boy kare olduğundan tüm kare sonucuna erişmek için kullanılan çarpan
- 10.000 : 0,1 mm^{3}' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan sabit.

Yapılan sayımların ortalaması alındı ve aşağıdaki gibi örneğinin konsantrasyonu hesaplandı:

$C = n \times 10^4$

Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml) = Sayılan Hücre Sayısı x 10^4 x Seyreltme Faktörü

Hücre sayım aşamasına geçmeden önce thoma lamı ve lamel % 70 etil alkol ile silindi. Hücre peleti üzerine, kültür besiyeri konularak hücre süspansiyonu haline getirildi ve buradan alınan hücreler 1/1 oranında % 0,4'lük tripan mavisi boya ile boyandı. Otomatik pipetör yardımı ile tripan mavisi ve hücre karışımından 10 µl alınan örneğin lam-lamel arasına dikkatlice yayılması sağlandı. Tripan mavisi membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikti. Bu nedenle, hücre sayımı yapılırken tripan mavisi ile boyanmayan hücreler canlı, boyalı hücreler ise ölü olarak kabul edildi **(Şekil 3.7.)**.



Şekil 3.7. Canlı ve ölü hücrelerin mikroskobik görüntüsü [109].

Mikroskop yardımıyla, 10x objektif kullanılarak hemositometrede tüm canlılık oranını belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

Canlılık oranı (%) = (Sayılan canlı hücre miktarı / Sayılan toplam hücre miktarı) x 100

3.2.3. Hücre Canlılığı Analiz Yöntemleri

3.2.3.1. *MTT Analizi Yöntemi*

MTT Solüsyonu Hazırlama:

1g MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 200 mL PBS (pH 7.4 , 5 mg/mL) ile alüminyum folyoya sarılan balon joje içerisinde karanlık ortamda vortekslenerek çözdürüldü. 0.22 µm filtreden geçirildi. Hazırlanan 12 µM'lık MTT stok solüsyonu karanlık +4 ˚C'lik ortamda 4 hafta boyunca saklanabilir. Deney aşamasından önce çözelti 37^0 C'lik su banyosunda ısıtıldı.

MTT Deney Aşaması:

- Klorpirifos, tannik asit ve çinkonun HEK 293 hücre canlılığı üzerine etkisini gözlemlemek için 3 ayrı 96'lik plate ile çalışıldı.
- 96'lık plate kuyucuklarına her kuyuda 10 000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- 37 ˚C'de %5 CO_2 inkübatöründe hücrelerin yapışması için 24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, kontrol, klorpirifos için 10, 30, 60, 90 µg/mL; tannik asit için 5, 10, 15, 20, 25 µM; çinko için 25, 50, 75, 100, 150 µM konsantrasyonlarında madde uygulandı ve 24 saat inkübe edildi.
- Her bir kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklendi ve 3 saat inkübe edildi.

- İnkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak 50 µL DMSO ilave edildi ve 10 dk daha inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikroplate okuyucu ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı.
- Kontrol kuyucukları okutularak elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Madde uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi.
- Böylece 24 saatlik MTT canlılık analizi sonuçları elde edildi.
- 48. ve 72. saat MTT canlılık analizi sonuçlarını elde etmek için farklı konsantrasyondaki maddelerin hücrelere uygulanma işleminden sonra inkübasyon süreleri 48 ve 72 saat olacak şekilde hazırlanan deneysel metot ile tüm işlemler tekrarlandı.

Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değerleri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

3.2.3.2. ***xCELLigence Analizi Yöntemi***

- HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattı, %10 fetal bovine serum ve %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM besiyerinde gerektiğinde pasajlama işlemleri yapılarak yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar kültür ortamında çoğaltıldı.
- Hücreler besiyeri ortamında 37 °C'de ve %5 CO_2 ile nemlendirilmiş inkübatörde T25 hücre kültürü flakslarında kültüre edildi.
- Hücreler flaskta %80 doluluğa ulaştığında steril hücre kazıyıcı ile kazındı ve falkon tüpüne aktarılarak soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Hücreler daha sonra e-plate'lere ekilmek üzere hücre sayım prosedürüne göre sayıldı ve sayım sonucu elde edilen hücre sayısı 1x 10^6 olarak hesaplandı.
- xCELLigence cihazının ana kısmı inkübatöre konulmadan önce % 70'lik alkolle silindi.
- Cihazla bilgisayarın bağlantısı yapıldıktan sonra RTCA programı açıldı ve deney notları kısmına gelinerek deneyle ilgili veriler girildi.

- ‘’Layout’’ sekmesi seçilerek deneyde kullanılacak kuyucukların seçimi, hücre türü, kuyu başına kullanılacak hücre sayısı, kullanılacak bileşiğin adı, konsantrasyonu ve konsantrasyon birimi bilgileri girildi.
- “Schedule” kısmında plakaların cihazdan çıkarılacağı her bir aşama (Step) ayrı ayrı planlandı: Step 1, Step 2 ve Step 3
- Step: 1 Interval: 1:00 Duration: 0:0:0
  - Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra 16 kuyulu e-plate’lerdeki her bir kuyuya 100 µL besiyeri konuldu ve bazal ölçüm almak için plateler inkübatör içerisindeki xCELLigence cihazına yerleştirildi.
  - Tüm kuyulardan sağlıklı bilgi alınıp alınmadığı “Step:1” aşaması ile kontrol edilmiş oldu.
  - Plateler inkübatörden laminer kabine alındı ve 16 kuyulu e-plate’lerin her bir kuyusuna yaklaşık $1.5x10^4$ hücre ekildi.
  - Hücreleri ektikten 24 saat sonra madde uygulanacağı için “Duration” seçeneği 24 saate; kuyulardan 15 dakika aralıklarla ölçüm almak için “Interval” seçeneği 15’e ayarlandı.
    - Step: 2 Interval 15:00 Duration: 24:00
  - Bu süre sonunda, toplamda 16 kuyusu bulunan plakalara klorprifos için 0, 10, 30, 60, 90 µg/mL; tannik asit için 0, 5, 10, 15, 20, 25 µM ve çinko oksit için 0, 25, 50, 75, 100, 150 µM konsantrasyonlarında madde uygulaması yapıldı. Hücre üzerine etkisi incelenen her bir madde için ayrı bir plaka kullanıldı.
    - Step: 3 Interval: 15:00 Duration: 96:00
  - 3. aşamada Duration 96 saat seçildi ve böylece maddenin eklendiği 24. Saatten itibaren hücrelerdeki değişimin ölçümü 3 gün boyunca (24-48 sa (1.gün), 48-72 sa (2.gün), 72-96 sa (3.gün)) her 15dk da bir kaydedildi ve sistem bu süre sonunda ölçüm yapmayı bıraktı.
- Süre sonunda sistemden, dibinde iyi bir iletken olan altın ile kaplı elektrotlara yapışan hücre sayısına ve kontrol grubuna göre, hücrelerdeki değişime bağlı olarak hücre indeksi değerleri elde edildi.
- İstatistiksel değerlendirmenin yapılabilmesi için gerekli uygun sayıya ulaşabilmek adına her bir madde için iki 16’lı e-plate kullanıldı ve toplamda 6 ölçüm sonucu elde edildi.

3.2.4. İstatiksel Analiz

Örneklerin WST-1 absorbans değerleri kullanılarak % canlılık değerleri hesaplandı. Analizlerden elde edilen tüm sonuçlar IBM SPSS 21 (Statistical Package for the Social Sciences) programı ile değerlendirildi. Grup içi istatistiksel karşılaştırmada parametrik gruplara One-Way ANOVA; parametrik olmayan gruplara ise Kruskal Wallis testleri uygulandı. Sonuçlar ortalama ± SD (standart sapma) olarak verildi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi. Sonuçlar tablo ve grafik halinde gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. MTT Hücre Canlılığı Analizi

Spektrofotometre ile ölçüm sonucunda elde edilen absorbans değerleri hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini göstermektedir ve bu absorbans değerleri canlı hücre sayısıyla ilişkilidir.

Kontrol grubunun absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiştir ve diğer absorbans değerleri ile canlılık değerleri hesaplanmıştır. Her bir örneğin tekrarlı ölçümlerinin ortalaması alınmıştır ve hücre % canlılık değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin ortalama absorbans değeri}}{\text{Kontrolün ortalama absorbans değeri}} \text{ x } 100$$

4.1.1. Klorpirifos'un Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi

10, 30, 60 ve 90 µg/mL klorpirifos ile 24 saat inkübe edilen HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri 96'lık platelere kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde 6'şar kez ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon süresi sona erdikten sonra ölçüm gerçekleştirildi. Aynı işlemler hücreler yeniden ekilerek ve yeniden klorpirifos uygulanarak 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için ayrı ayrı tekrarlandı. Klorpirifos eklenilmeyen kontrol grubunda canlılık %100 kabul edildi diğer değerler kontrol grubuna göre hesaplandı.

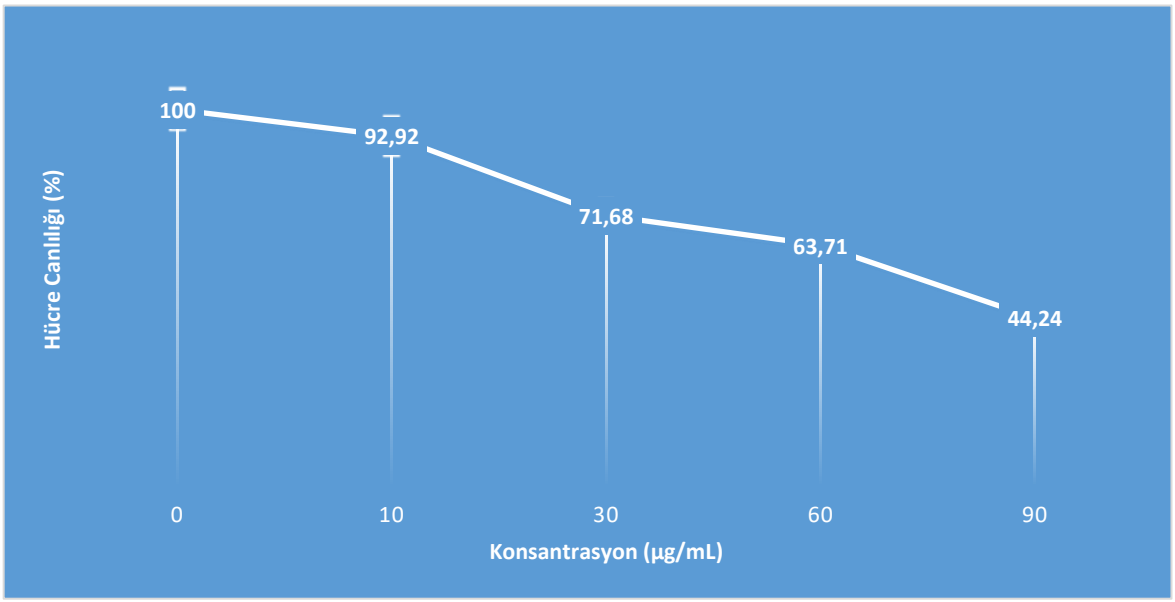
4.1.1.1. *24 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Klorpirifosun 10 µg/mL uygulandığı grubun MTT değerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (sırasıyla $^{a}p<0.05$). 30 µg/mL, 60 µg/mL ve 90 µg/mL klorpirifos uygulanan grupların MTT değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($^{b}p<0.001$). Veriler **Tablo 4.1**'de ve **Şekil 4.1**'de gösterildi. HEK293 hücrelerinde klorpirifosa ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 79,94 µg/mL bulunmuştur.

Tablo 4.1. Klorpirifos'un (KP) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	10 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	90 µg/mL
MTT (570 nm)	0,226±0,03	0,204±0,06[a]	0,157±0,04[b]	0,140±0,03[b]	0,097±0,05[b]

[a]p<0.05 ve [b]p<0.001 kontrole kıyasla



Şekil 4.1. Klorpirifos'a (KP) ait 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

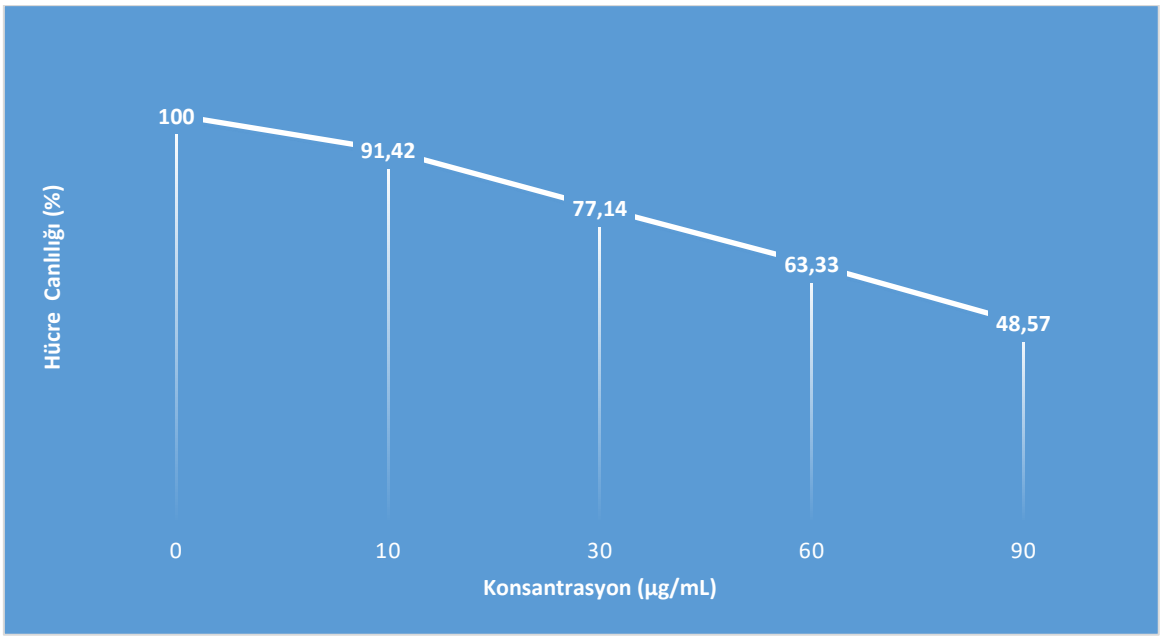
4.1.1.2. *48 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Klorpirifosun 10 µg/mL, 30 µg/mL ve 60 µg/mL uygulanan gruplarının absorbans değerlerinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak artmış olduğu ([a]p<0.001) görüldü. 10 µg/mL klorpirifos dozunun uygulandığı grubun MTT değerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü ([b]p<0.05). Veriler **Tablo 4.2**'de ve **Şekil 4.2**'de gösterildi. HEK293 hücrelerinde klorpirifosa ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 85,95 µg/mL bulunmuştur.

Tablo 4.2. Klorpirifos'un (KP) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	10 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	90 µg/mL
MTT (570 nm)	0,210±0,02	0,191±0,02[a,b]	0,162±0,01[a]	0,133±0,01[a]	0,102±0,01

[a]p<0.001 90 µg/mL'ye kıyasla ve [b]p<0.001 kontrole kıyasla



Şekil 4.2. Klorprifos'a (KP) ait 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

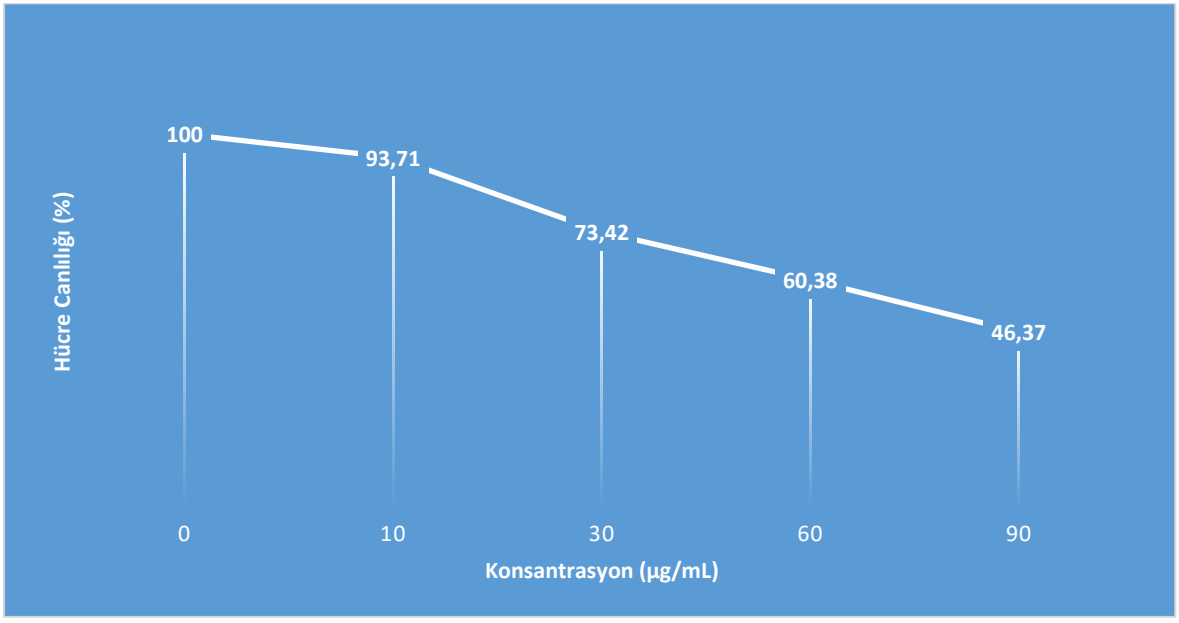
4.1.1.3. *72 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

72 saatlik MTT sonuçlarına göre 30, 60, 90 µg/mL uygulanan grupların absorbans değerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ([a]p<0.001). Kontrol ve 10 µg/mL klorpirifos uygulanan grupların 72 saatlik MTT sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmemiştir. Veriler **Tablo 4.3**'te ve **Şekil 4.3**'te gösterildi. HEK293 hücrelerinde klorpirifosa ait IC_{50} değeri 72 saatlik maruziyette 80,23 µg/mL bulunmuştur.

Tablo 4.3. Klorpirifos'un (KP) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

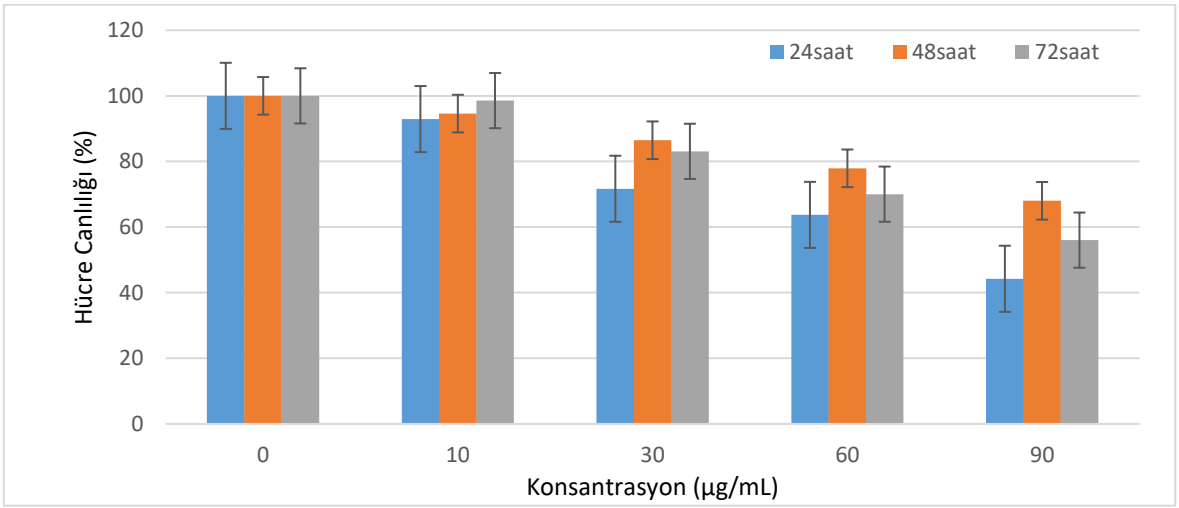
Parametre	Kontrol	10 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	90 µg/mL
MTT (570 nm)	0,207±0,03	0,187±0,06	0,147±0,02[a]	0,121±0,03[a]	0,092±0,05 [a]

[a]p<0.001 kontrole kıyasla.



Şekil 4.3. Klorpirifos'a ait 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

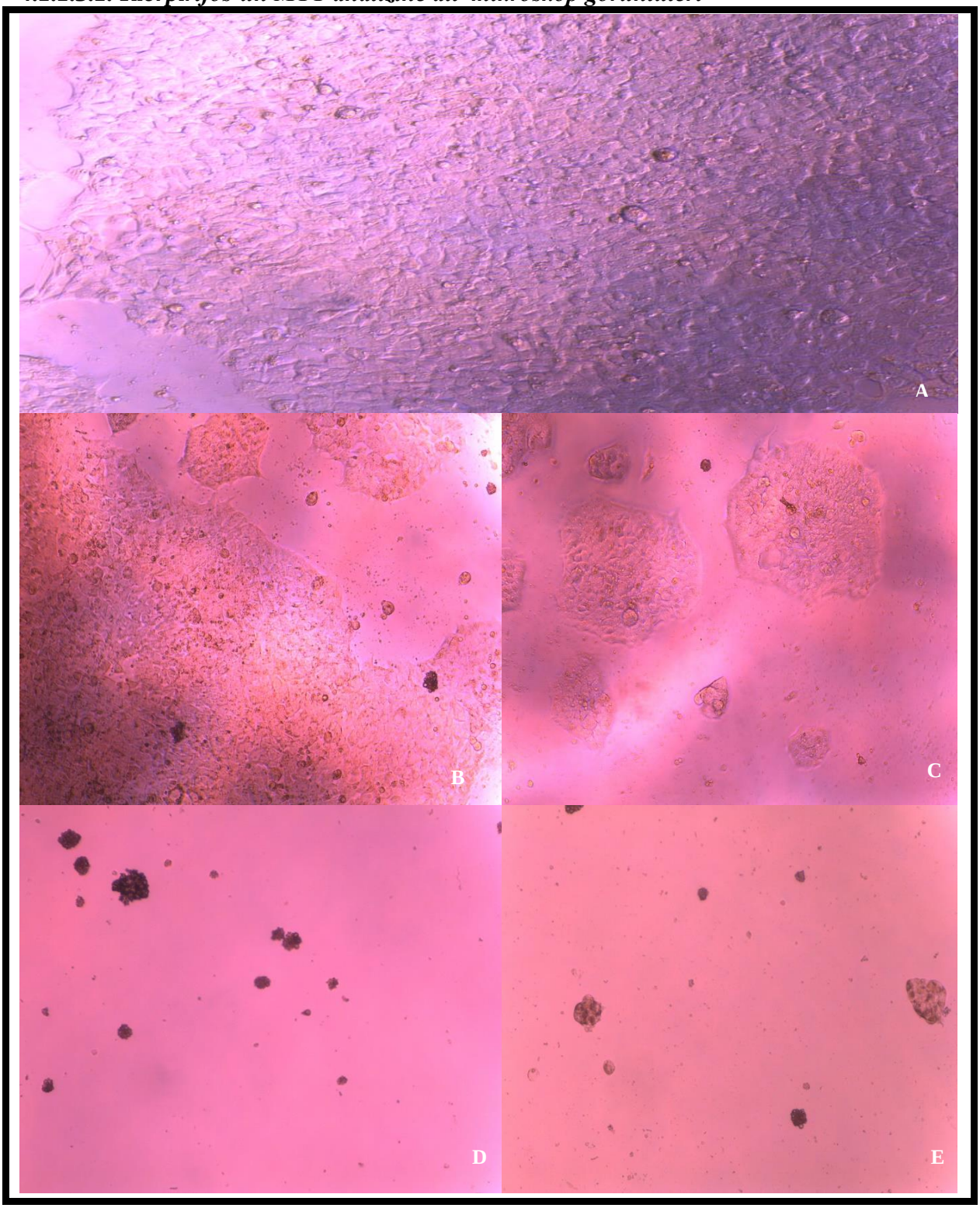
Klorpirifos dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiğine göre hücre canlılığı 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik süreler boyunca azaldı. Veriler **Şekil 4.4**'te gösterildi.



Şekil 4.4. Klorpirifos dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği.

Klorpirifos'un MTT analizine ait mikroskop görüntülerinde de klorpirifos doz artışı ile hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlendi. Veriler **Şekil 4.5**'te gösterildi.

4.1.1.3.1. Klorpirifos'un MTT analizine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 4.5. Kontrol (A), 10 µg/mL (B), 30 µg/mL (C), 60 µg/mL (D), 90 µg/mL (E) Klorpirifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri.

4.1.2. Tannik Asit'in Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi

5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit ile 24 saat inkübe edilen HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri 96'lık platelere kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde 6'şar kez ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon süresi sona erdikten sonra absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Aynı işlemler hücreler yeniden ekilerek ve yeniden tannik asit uygulanarak 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için ayrı ayrı tekrarlandı.

Tannik asit eklenilmeyen kontrol grubunda canlılık %100 kabul edildi diğer değerler kontrol grubuna göre hesaplandı.

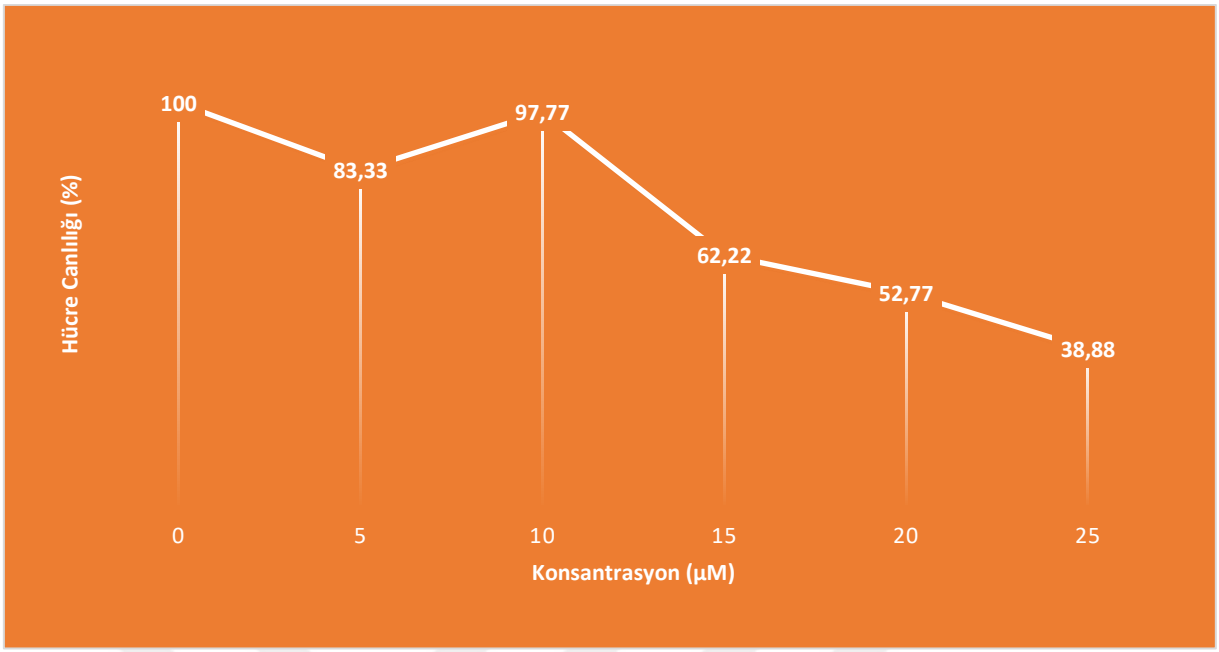
4.1.2.1. *24 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Tannik asitin 5µM uygulandığı grupta absorbansın kontrol grubuna göre $^{a}p<0.01$ anlamlı olarak azaldığı görüldü. 15 µM, 20 µM ve 25µM tannik asit uygulanan gruplarda ise absorbans değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($^{b}p<0.001$) belirlendi. Tannik asitin 25 µM uygulandığı grubun absorbans değerinin diğer çalşma gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($^{c}p<0.001$). Veriler **Tablo 4.4**'de ve **Şekil 4.6**'da gösterildi. HEK293 hücrelerinde tannik asite ait IC_{50} değeri 24 saatlik maruziyette 21,34 µM bulunmuştur.

Tablo 4.4. Tannik Asit'in (TA) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	**Kontrol**	**5 µM**	**10µM**	**15 µM**	**20µM**	**25 µM**
MTT (570 nm)	0,18±0,08	$0,155\pm0,04^{a,c}$	$0,176\pm0,04^{c}$	$0,112\pm0,06^{b,c}$	$0,095\pm0,04^{b,c}$	$0,07\pm0,07^{b,c}$

$^{a}p<0.01$, $^{b}p<0.001$ kontrole kıyasla; $^{c}p<0.001$ 25 µM' a kıyasla



Şekil 4.6. Tannik asitin 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

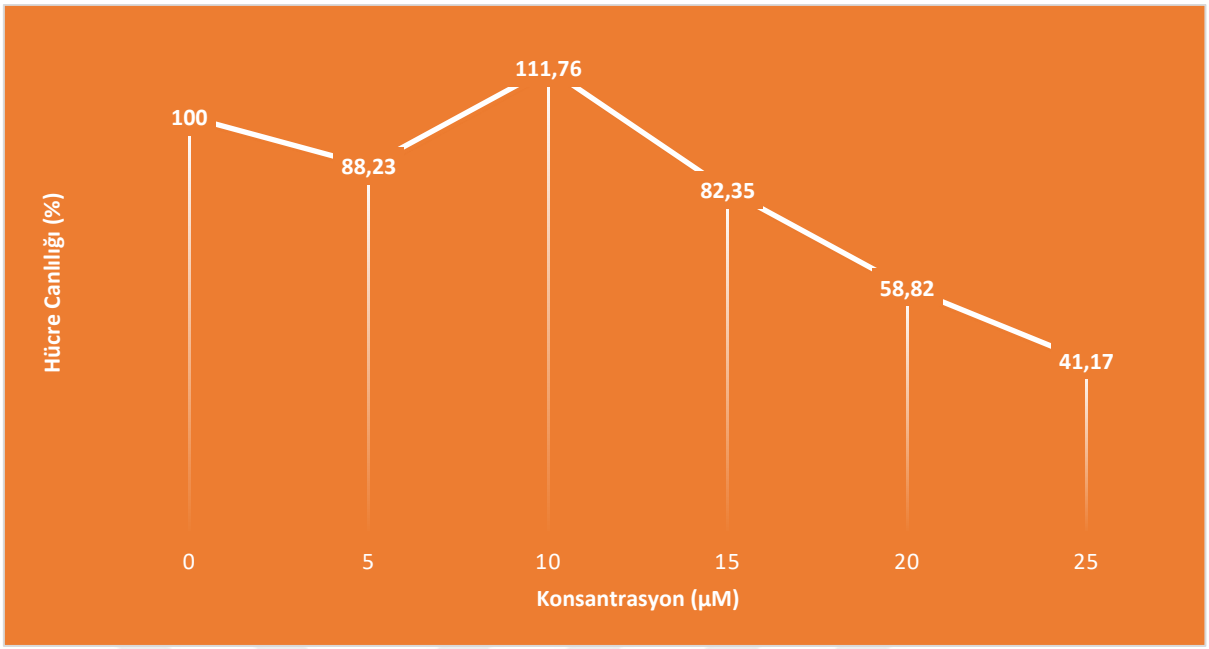
4.1.2.2. *48 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Tannik asitin farklı dozlarda uygulandığı grupların 48 saat sonraki verileri incelendiğinde 10 µM uygulanan grupta kontrole göre anlamlı artışlar gözlendi ($^{a}p<0.01$). 20 µM ve 25 µM yüksek dozlarda ise absorbans değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($^{b}p<0.001$). 10 µM uygulanan grubunun absorbans değerinin 5 µM ve 15 µM gruplarına göre ($^{c}p<0.01$) ve 20 µM ve 25 µM'lık gruplara göre ($^{d}p<0.001$) anlamlı olarak arttığı görüldü. Veriler **Tablo 4.5** ve **Şekil 4.7**'de gösterildi. HEK293 hücrelerinde tannik asite ait IC_{50} değeri 48 saatlik maruziyette 23,99 µM bulunmuştur.

Tablo 4.5. Tannik Asit'in (TA) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,17±0,01	0,15±0,01^{c}	0,19±0,01^{a}	0,14±0,02^{b,c}	0,10±0,03^{b,d}	0,07±0,02^{b,d}

$^{a}p<0.01$ $^{b}p<0.001$ kontrole kıyasla; $^{c}p<0.01$, $^{d}p<0.05$ 10 µM' a kıyasla



Şekil 4.7. Tannik asitin 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

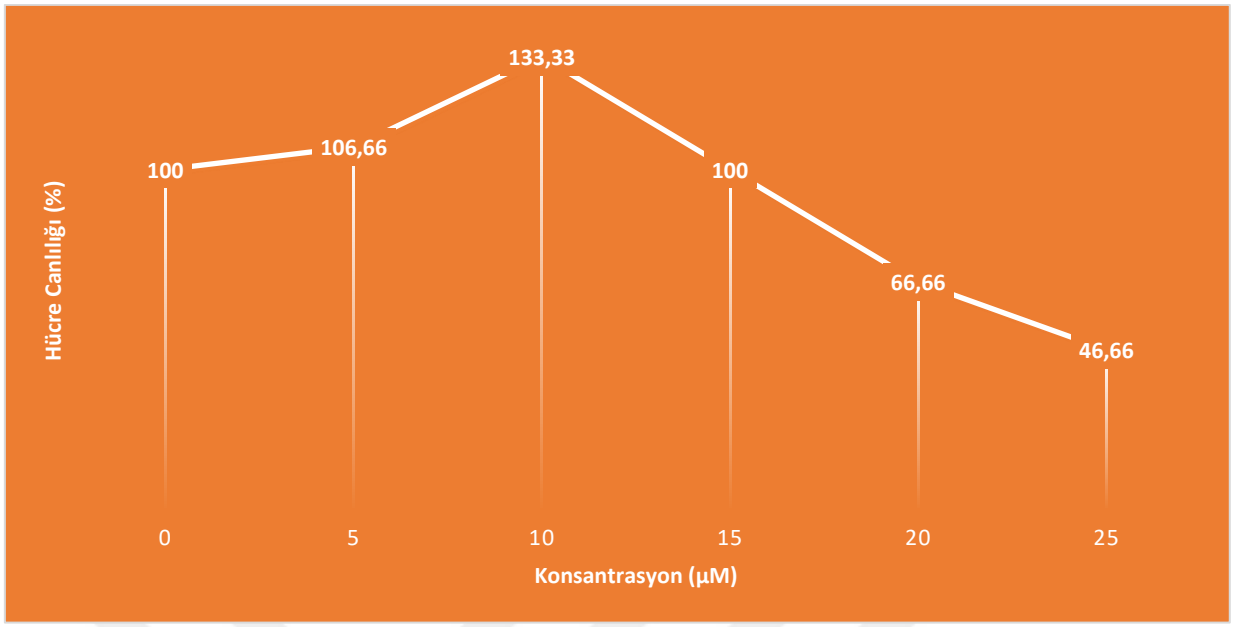
4.1.2.3. *72 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Tannik asitin 10µM uygulandığı grupta absorbans değeri kontrole göre artmışken ($^{a}p<0.001$), 20 µM ve 25µM uygulandığı gruplarda ise azaldı ($^{b}p<0.001$). 25 µM uygulanan grubun değerleri tüm gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($^{c}p<0.001$). Veriler **Tablo 4.6** ve **Şekil 4.8**'de gösterildi. HEK293 hücrelerinde tannik asite ait IC_{50} değeri 72 saatlik maruziyette 25,89 µM bulunmuştur.

Tablo 4.6. Tannik Asit'in (TA) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

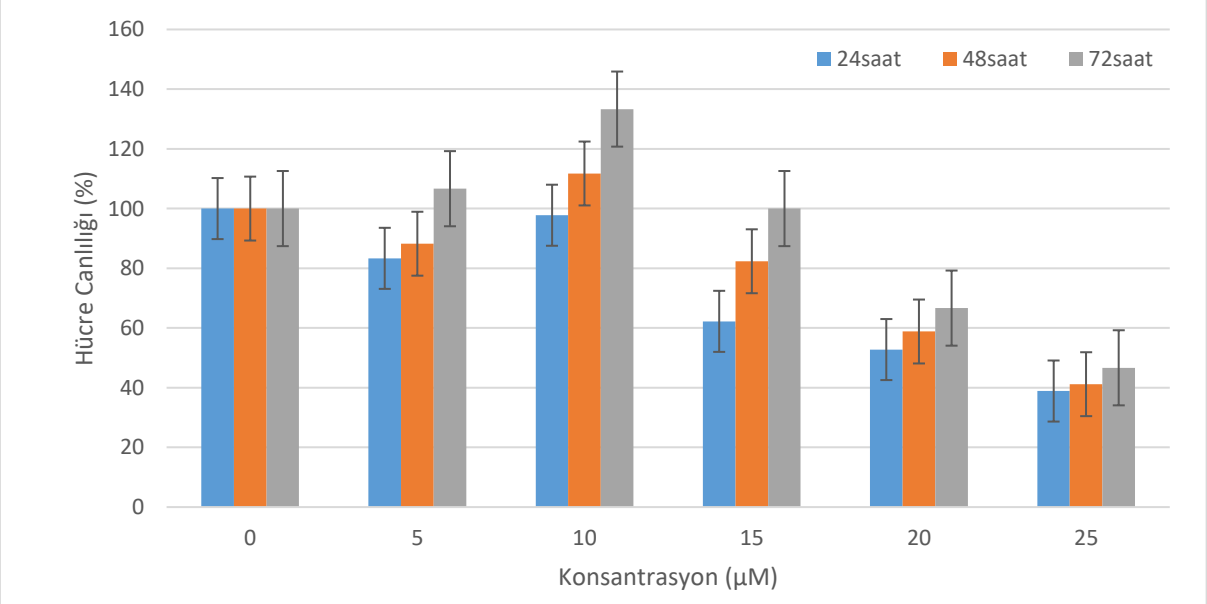
Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,15±0,02	0,161±0,01^{c}	0,20±0,01^{a,c}	0,153±0,01^{a,c}	0,10±0,01^{b,c}	0,07±0,01^{b,c}

$^{a}p<0.001$, $^{b}p<0.001$ kontrole kıyasla; $^{c}p<0.001$ 25 µM' a kıyasla



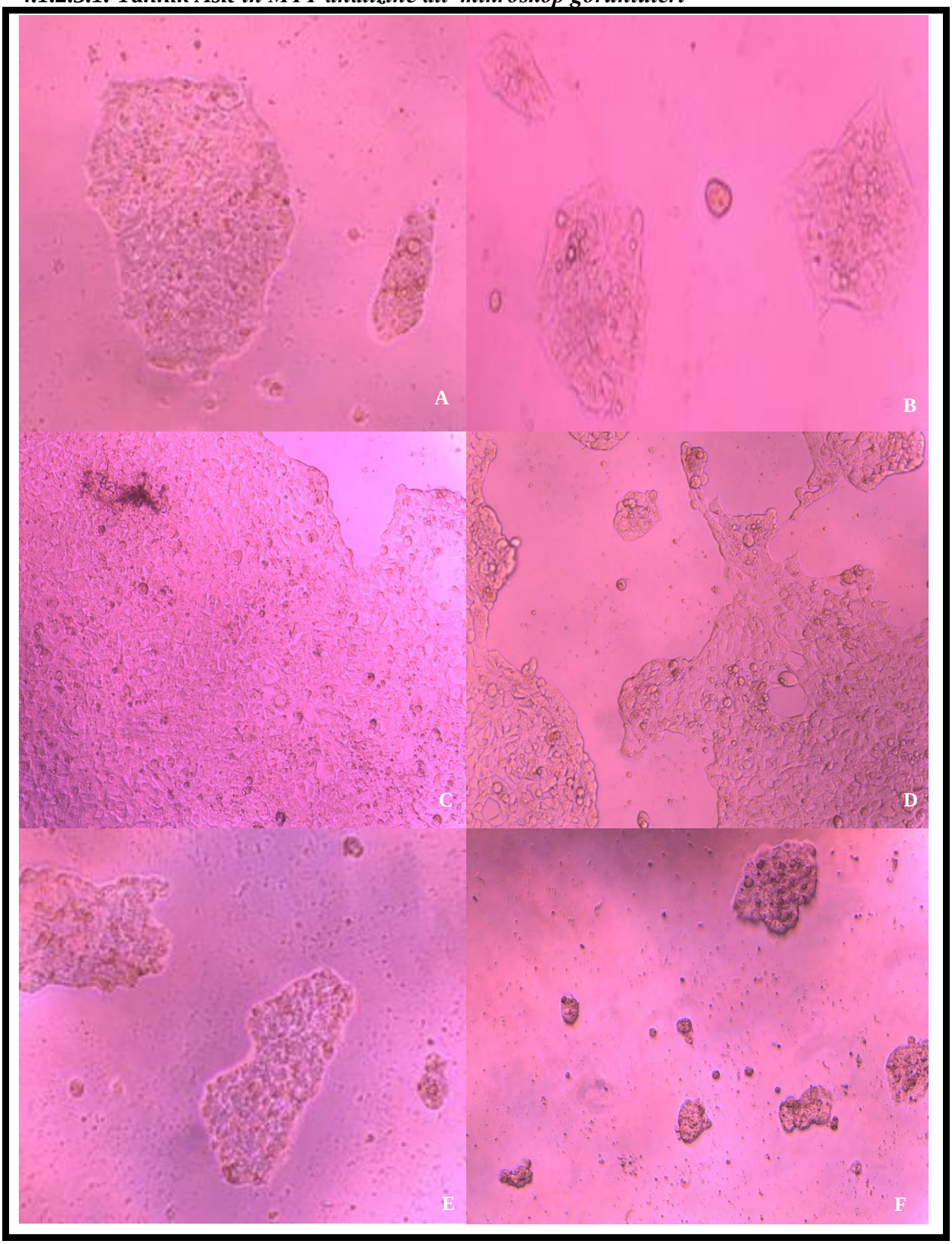
Şekil 4.8. Tannik asitin 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

Tannik asit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiğine göre hücre canlılığı 24 saatlik süre için 10 µM'da kontrole yakın bir değerde olduğu, 48 saat ve 72 saatlik süreler için ise 10 µM'da hücre canlılığının daha fazla olduğu belirlendi. Veriler **Şekil 4.9**'da gösterildi. Tannik asit' in MTT analizine ait mikroskop görüntülerinde de 10 µM'da hücre canlılığının daha fazla olduğu gözlemlendi. Veriler **Şekil 4.10**'da gösterildi.



Şekil 4.9. Tannik asit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği

4.1.2.3.1. Tannik Asit'in MTT analizine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 4.10. Kontrol (A), 5 µM (B), 10 µM (C), 15 µM (D), 20 µM (E), 25 µM (F) Tannik asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri.

4.1.3. Çinko Oksit'in (ZnO) Doza Bağlı Etkisinde MTT Hücre Canlılığı Analizi

25, 50, 75, 100 ve 150 µM Çinko Oksit (ZnO) ile 24 saat inkübe edilen HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri 96'lık platelere kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde 6'şar kez ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon süresi sona erdikten sonra ölçüm gerçekleştirildi. Aynı işlemler hücreler yeniden ekilerek ve yeniden Çinko Oksit uygulanarak 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için ayrı ayrı tekrarlandı.

Çinko Oksit (ZnO) eklenilmeyen kontrol grubunda canlılık %100 kabul edildi diğer değerler kontrol grubuna göre hesaplandı.

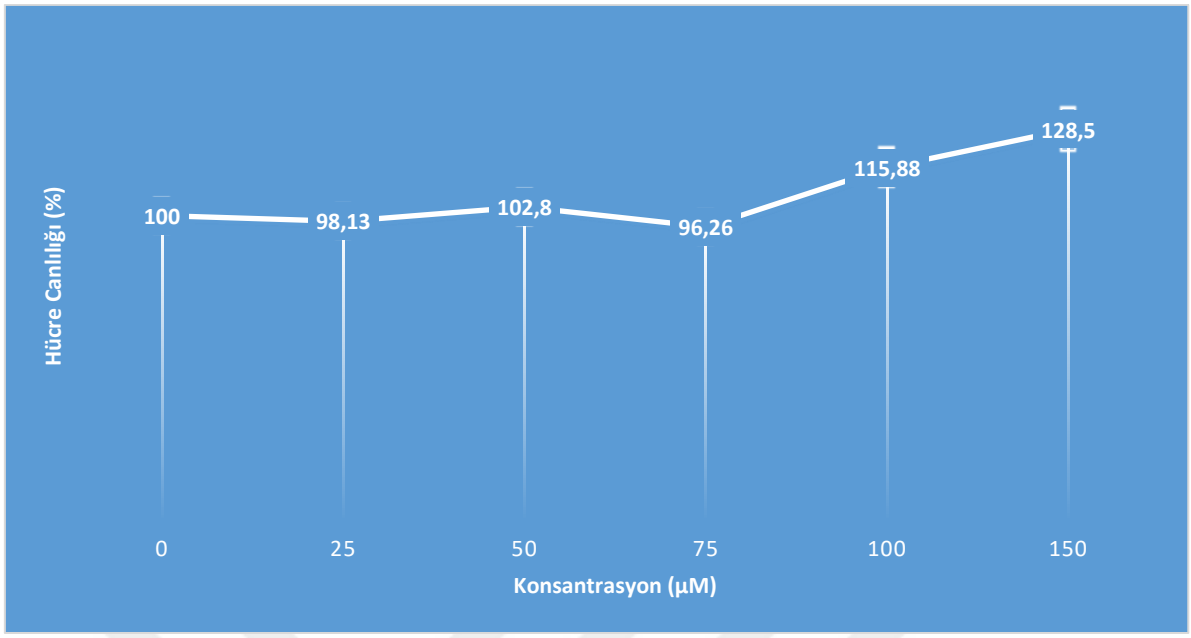
4.1.3.1. *24 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Çinko Oksit'in 100 µM uygulandığı grubun absorbans değerinin 50 µM uygulanan grup ($^a p<0.05$) ile 25 µM ve 75 µM ($^b p<0.01$) uygulanan gruplara göre anlamlı olarak arttığı görüldü. Kontrol grubunun absorbans değerinin 100 µM ve 150 µM uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($^c p<0.001$). Veriler **Tablo 4.7** ve **Şekil 4.11**'de gösterildi. Çalışmada kullandığımız Çinko Oksit dozları ile IC_{50} değeri hesaplanamadı.

Tablo 4.7. Çinko Oksit'in (ZnO) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	**Kontrol**	**25 µM**	**50µM**	**75 µM**	**100µM**	**150 µM**
MTT (570 nm)	0,214±0,01	0,219±0,01^b	0,228±0,01^a	0,206±0,02^b	0,248±0,01^c	0,275±0,01^c

$^a p<0.05$, $^b p<0.01$ 100 µM' a kıyasla; $^c p<0.01$ kontrole kıyasla



Şekil 4.11. Çinko Oksit'in (ZnO) 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

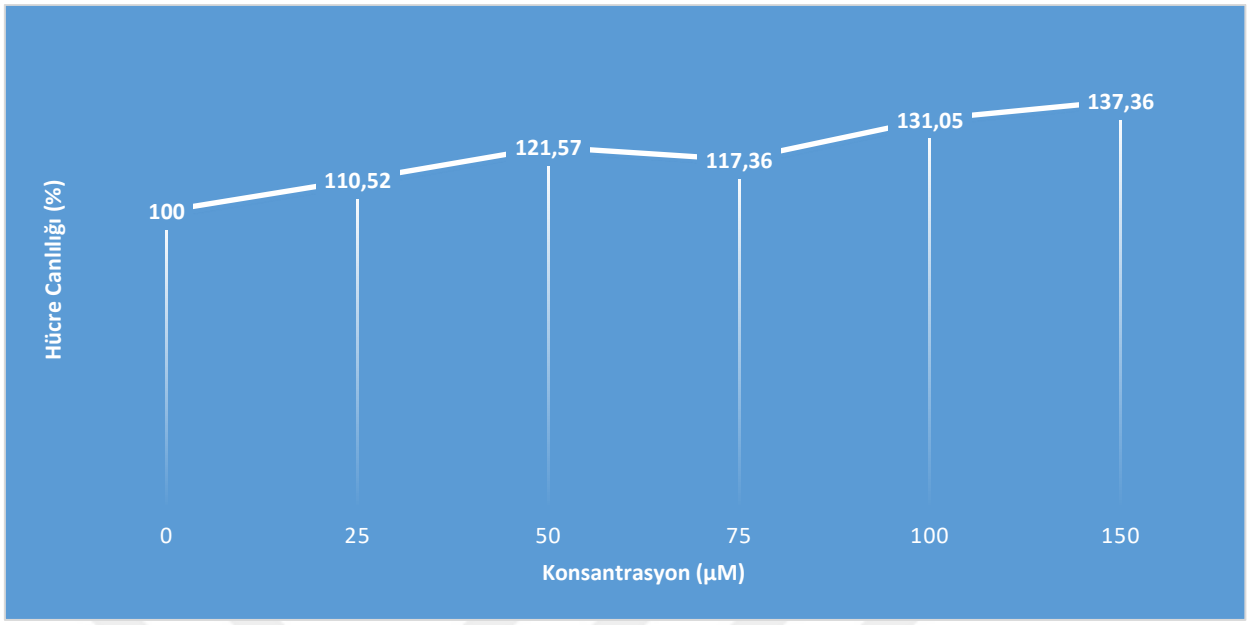
4.1.3.2. *48 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Çinko Oksit'in 50µM ve 75µM uygulandığı grupların absorbans değerleri ($^{a}p<0.01$) ile 100µM ve 150µM uygulandığı grupların absorbans değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($^{b}p<0.001$) arttığı görüldü. Veriler **Tablo 4.8**'de ve **Şekil 4.12**'de gösterildi.

Tablo 4.8. Çinko Oksit'in (ZnO) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	**Kontrol**	**25 µM**	**50µM**	**75 µM**	**100µM**	**150 µM**
MTT (570 nm)	0,19±0,05	0,21±0,07[a]	0,231±0,05[a]	0,223±0,04[a]	0,249±0,03[b]	0,261±0,04[b]

[a]p<0.01, [b]p<0.001 kontrole kıyasla



Şekil 4.12. Çinko Oksit'in (ZnO) 48 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

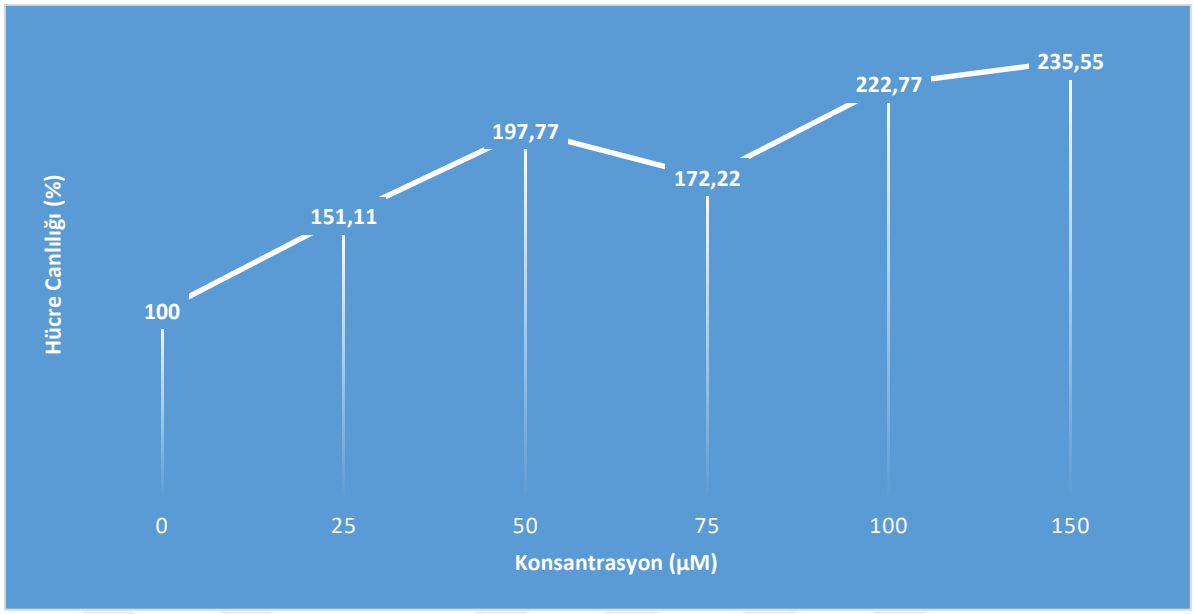
4.1.3.3. *72 saatlik MTT Analiz Sonuçları*

Çinko Oksitin tüm çalışma gruplarındaki absorbans değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü ($^{a}p<0.001$). 150 µM uygulanan grubun absorbans değerinin 25 µM, 50 µM ve 75 µM uygulanan gruplara göre anlamlı olarak artmış olduğu görüldü ($^{b}p<0.001$). Veriler **Tablo 4.9**'da ve **Şekil 4.13**'de gösterildi.

Tablo 4.9. Çinko Oksit'in (ZnO) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

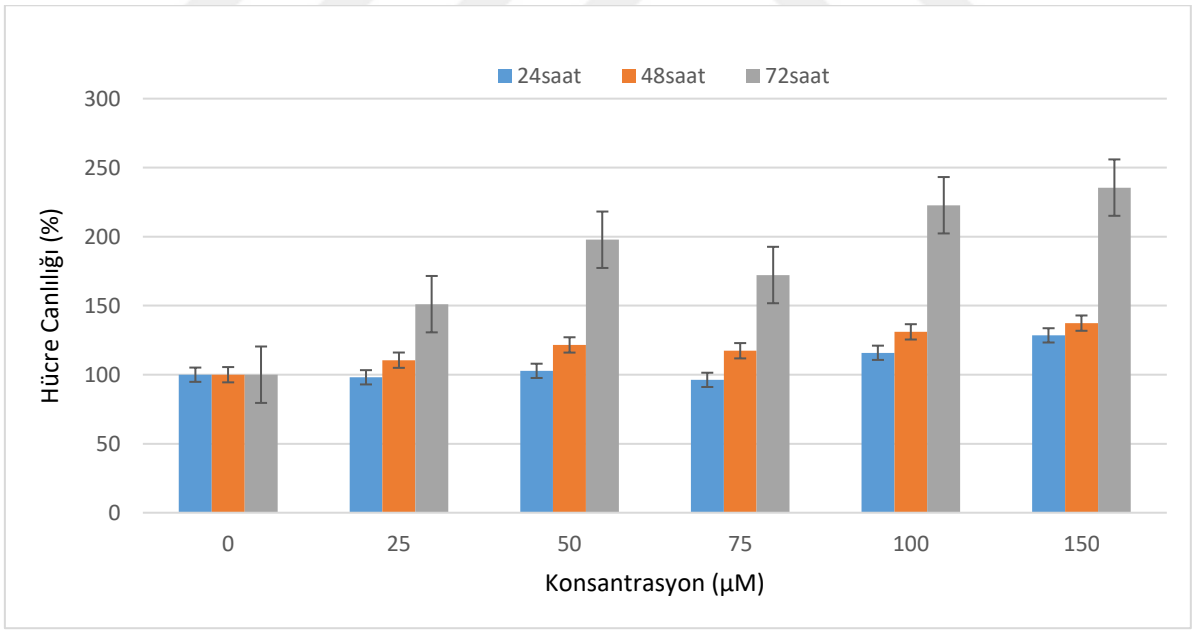
Parametre	**Kontrol**	**25 µM**	**50µM**	**75 µM**	**100µM**	**150 µM**
MTT (570 nm)	0,18±0,02	0,272±0,03^{a,b}	0,356±0,07^{a,b}	0,310±0,05^{a,b}	0,401±0,02^{a}	0,424±0,02 ^{a}

$^{a}p<0.001$ kontrole kıyasla; $^{b}p<0.001$ 150 µM' a kıyasla.



Şekil 4.13. Çinko Oksit'in (ZnO) 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği.

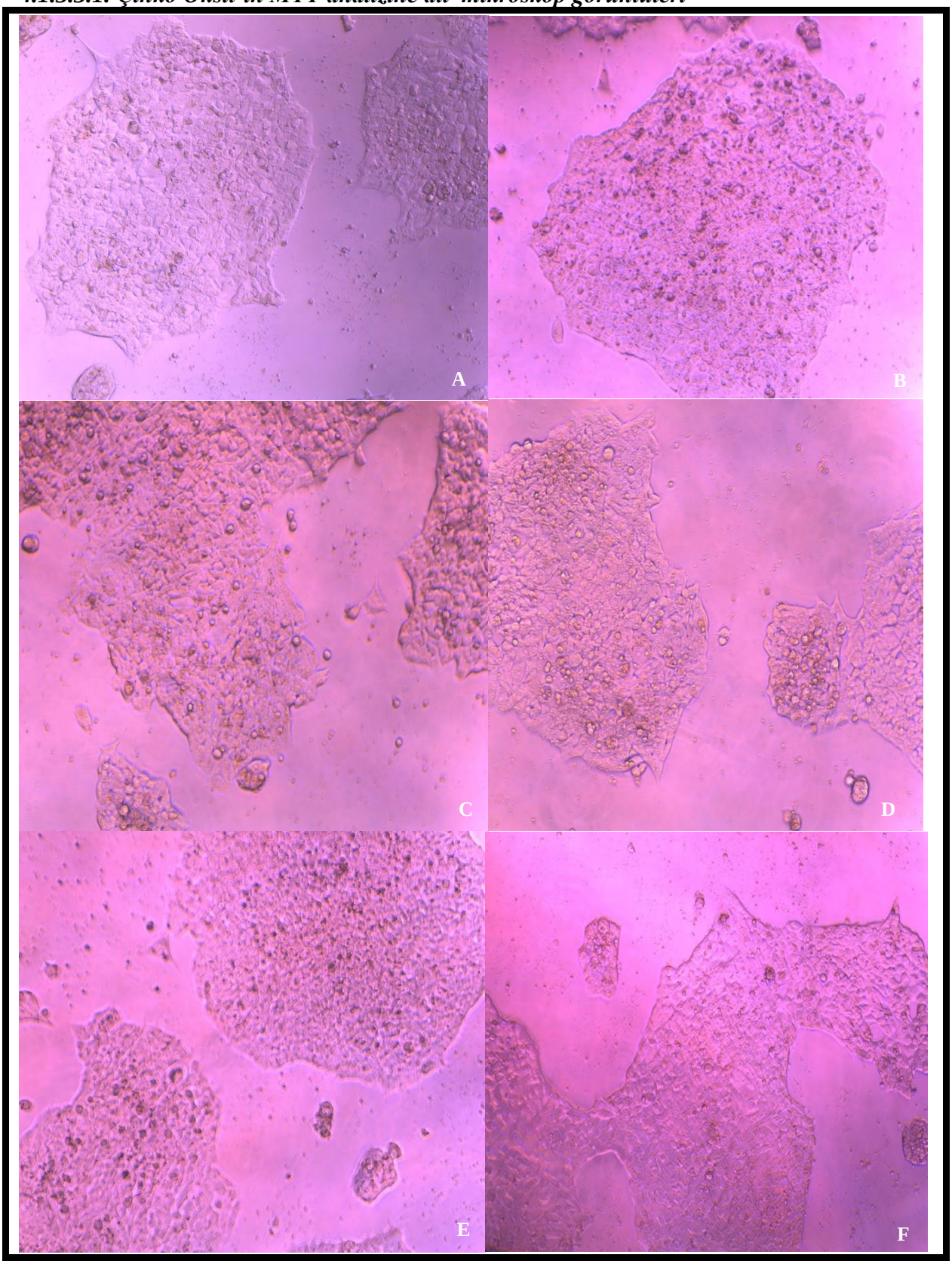
Çinko Oksit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiğine göre hücre canlılığı 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik süreler boyunca artış gösterdi. Veriler **Şekil 4.14**'te gösterildi.



Şekil 4.14. Çinko Oksit dozlarının hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiği.

Çinko Oksit MTT analizine ait mikroskop görüntülerinde de çinko oksit doz artışı ile hücre canlılığında artma olduğu gözlemlendi. Veriler **Şekil 4.15**'te gösterildi.

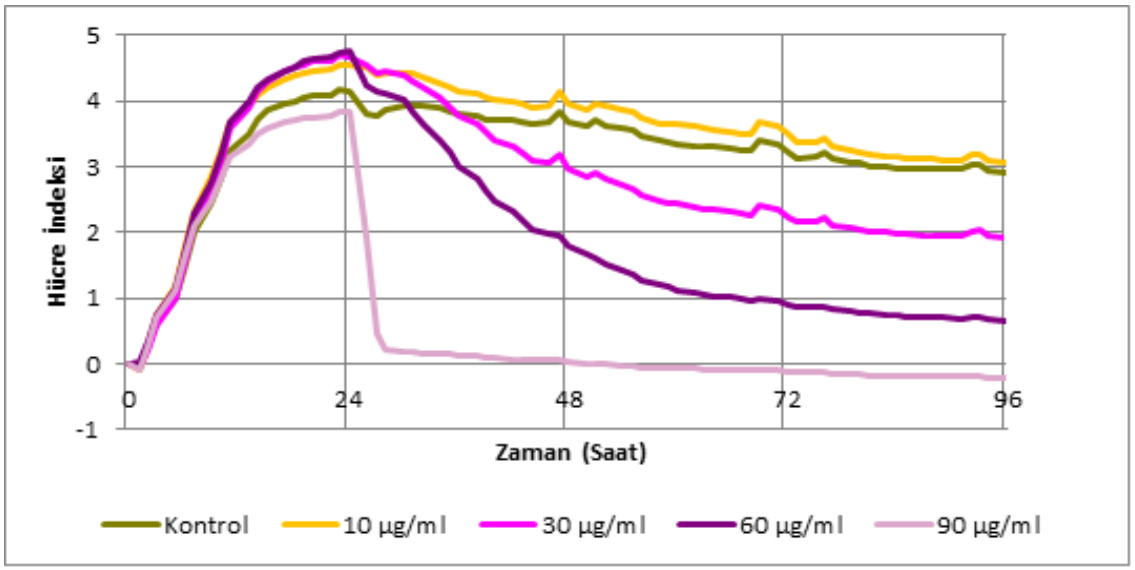
4.1.3.3.1. Çinko Oksit'in MTT analizine ait mikroskop görüntüleri



Şekil 4.15. Kontrol (A), 25 µM (B), 50 µM (C), 75 µM (D), 100 µM (E), 150 µM (F) Çinko Oksite'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin mikroskobik görüntüleri.

4.2. xCELLigence Analiz Sonuçları

4.2.1. Klorprifos'un xCELLigence Analiz Sonuçları



Şekil 4.16. Değişen konsantrasyonlarda Klorprifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri.

4.2.1.1. *24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 30 µg/mL ve 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruplarda hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.01$). Veriler **Şekil 4.16**'da gösterildi.

4.2.1.2. *48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

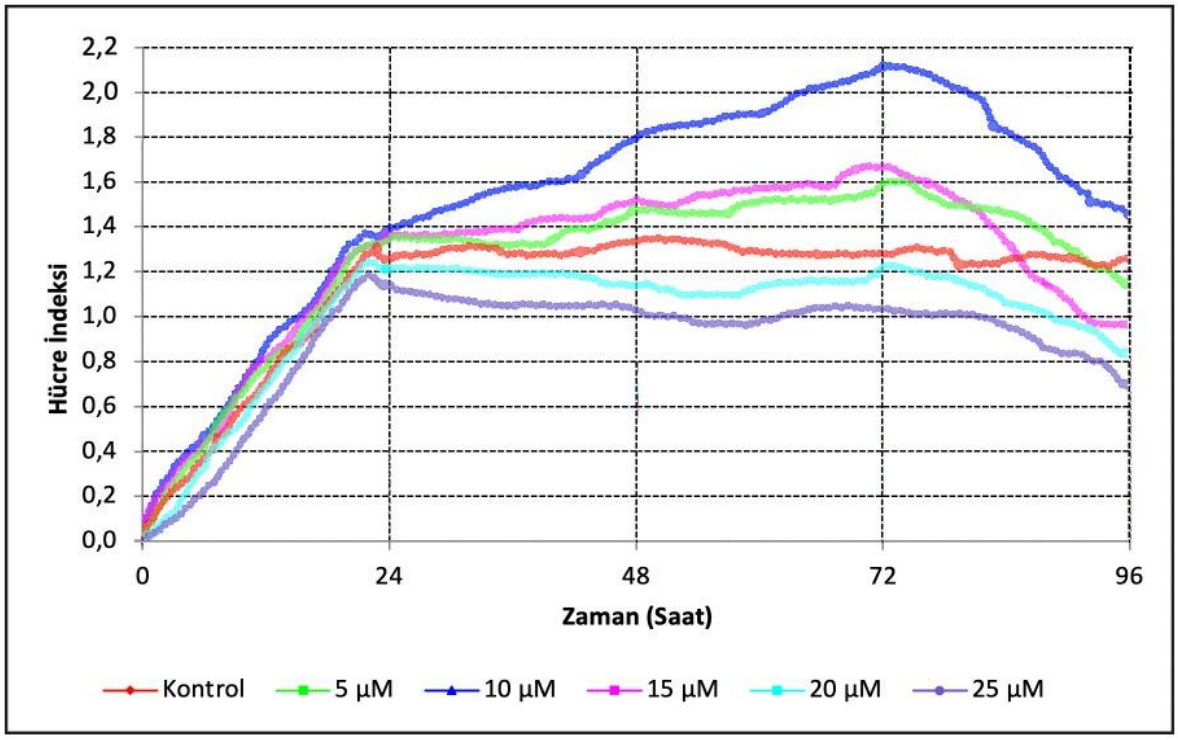
HEK293 hücrelerinin 48 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre 60 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin 10 µg/mL uygulanan gruba göre daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol grubu ve 10 µg/mL uygulanan grupların hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Veriler **Şekil 4.16**'da gösterildi.

4.2.1.3. *72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre 10 µg/mL uygulanan grubun hücre indeksinin 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.01$). 90 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin

kontrol ve 10 µg/mL uygulanan gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.001$). Veriler **Şekil 4.16**'da gösterildi.

4.2.2. Tannik Asit'in xCELLigence Analiz Sonuçları



Şekil 4.17. Değişen konsantrasyonlarda Tannik Asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri.

4.2.2.1. *24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 25 µM tannik asit uygulanan grubun hücre indeksinin 20 µM uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.01$) belirlendi. 20 µM ve 25 µM tannik asit uygulanan grupların hücre indeksinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı ($p<0.001$). Veriler **Şekil 4.17**'de gösterildi.

4.2.2.2. *48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

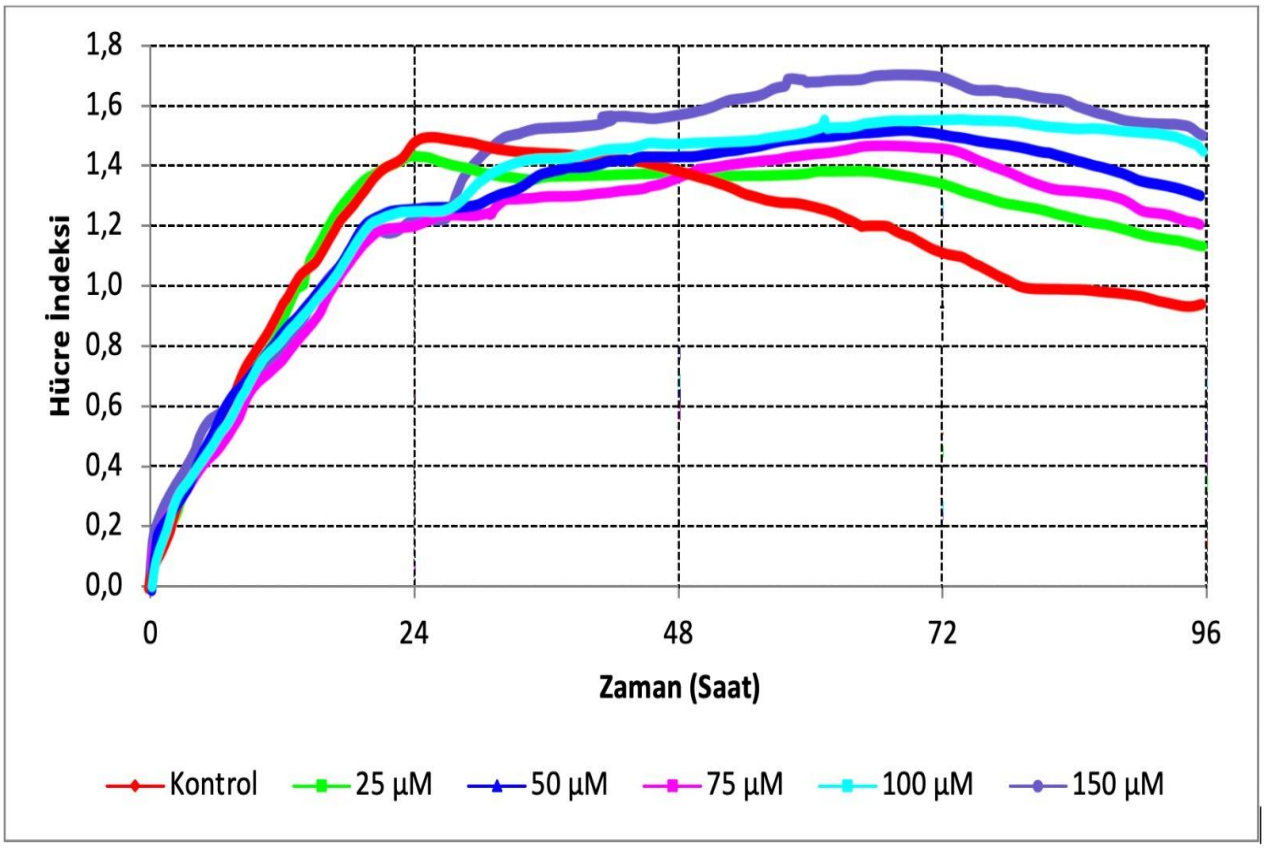
HEK293 hücrelerinin 48 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, 15 µM tannik asit uygulanan grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu belirlendi ($p<0.05$). 20 µM ve 25 µM uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$). Tannik

asitin 10 µM uygulandığı grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu görüldü ($p<0.05$). Veriler **Şekil 4.17**'de gösterildi.

4.2.2.3. *72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre 20 µM ($p<0.001$) ve 25 µM ($p<0.001$) uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Tannik asitin 10 µM uygulandığı grubun hücre indeksi kontrol ($p<0.01$), 20 ve 25 µM uygulana gruplara göre $p<0.001$ anlamlılığında yüksektir. Veriler **Şekil 4.17**'de gösterildi.

4.2.3. Çinko Oksit'in xCELLigence Analiz Sonuçları



Şekil 4.18. Değişen konsantrasyonlarda Çinko Oksit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri.

4.2.3.1. *24 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, 100 µM ve 150 µM Çinko Oksit uygulanan grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$). 25 µM ile kontrol grubu arasında fark

bulunamadı. 50 μM uygulanan grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Veriler **Şekil 4.18**'de gösterildi.

4.2.3.2. *48 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 48 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, kontrol grubuna göre 25 μM ($p<0.05$), 50 μM ($p<0.01$), 75 μM ($p<0.05$), 100 μM ve 150 μM Çinko Oksit uygulanan grupların hücre indeksi $p<0.001$ anlamlılığında yüksek bulundu. Veriler **Şekil 4.18**'de gösterildi.

4.2.3.3. *72 saatlik xCELLigence Analiz Sonuçları*

HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, 100 μM ve 150 μM Çinko Oksit uygulanan grupların hücre indeksi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). 100 μM ve 150 μM Çinko Oksit uygulanan grupların hücre indeksi 25 μM, 50 μM ve 75 μM uygulanan gruplara göre de anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Veriler **Şekil 4.18**'de gösterildi.

5. TARTIŞMA

Tarımda verimi artırmak ve zararlı organizmaları yok etmek amacıyla yaygın bir kullanım alanına sahip olan pestisitlerin, toprakta, suda ve ürünlerin üzerinde uzun zaman bozulmadan kalabildiği ve besin zinciri ile insanlara kadar ulaşabildiği bilinmektedir. Bu kimyasal maddelerin en önemli özellikleri canlı vücuduna girdiğinde doz ve süreye bağlı olarak toksik etki meydana getirmeleridir [1,7,8,10,32]. Pestisitler içerisinde, tarımda özellikle zararlı böceklerle mücadelede kullanılan ve dünya genelinde en çok kullanılan insektisit grubunun organofosfatlı insektisitler olduğu bilinmektedir [26,36]. Emilim sonrasında organofosfatlı insektisitlerin çoğunlukla yağ dokusunda, karaciğerde, böbreklerde ve tükürük bezlerinde biriktikleri bildirilmiştir. Maruz kalınan organofosfatlı insektisitlerin kimyasal yapısının, miktarının, maruziyet şeklinin, metabolik aktivasyon sürecinin ve yıkımının da zehirlenme durumunda etkili faktörler olduğu bilinmektedir [37, 38].

Organofosfatlı insektisitler kimyasal yapılarından dolayı yağda çözünebilirler (lipofiliktir) ve noniyonizedir. Lipofilik özelliklerinden dolayı hücre membranını, kan beyin bariyerini geçebilirler ve hasara yol açabilirler [37, 38]. Çalışmamızda kullandığımız klorpirifos toksisite yönünden orta düzeyde riskli olan bir organofosfatlı insektisittir.

Klorpirifosa maruziyet hepatotoksisite, nörotoksisite ve endokrin sistem bozulması gibi olumsuz etkilere yol açar. Klorpirifos merkezi sinir sisteminde nörolojik toksisite yanında DNA hasarına da neden olarak çok ciddi hasarlara yol açmaktadır. Bazı çalışmalar klorpirifosa maruziyetin gelişimsel bozuklukla, otoimmün bozuklukla, akciğer, böbrek ve meme kanseri gibi kanser türleriyle bağlantılı olduğunu da göstermiştir [110].

Ulusal Bilimler Akademisi raporu, 21. yüzyılda toksisite testlerinde, in vitro yola dayalı toksisite testini genişletmek ve tüm hayvan yaklaşımlarını en aza indirmek için diğer bilimsel araçların kullanımına yönelik bir paradigma değişikliğinin temelini atmıştır (Ulusal Araştırma Konseyi, 2007). Maruz kalan insan hücre kültürlerinin biyoinformatik analizleri gibi bu alternatif yöntemler, bir yaklaşım kullanarak in vivo toksisiteyi tahmin etmede kabul görmektedir [77]. Geleneksel olarak, pestisitlerin toksik potansiyelini incelemek için hayvan modelleri kullanılmaktadır. Toksisiteyi tespit etmek için in vivo modellerin kullanılması zaman, etik ve maliyet açısından pratik olmadığı anlayışı kabul görmeye başlamıştır. In vitro hücre kültürü sistemlerinin, kimyasallar veya ilaca maruz kalma yoluyla hedef organlarda

toksisite tahmini için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Hücre tabanlı sistemler, yüksek düzeyde entegrasyon sunduğundan, kimyasalların bozulmamış hücrelerle etkileşimlerini incelemek için popüler hale gelmiştir. Toksisite çalışmaları için karaciğer, böbrek, nöron vb. çeşitli in vitro hücre sistemleri geliştirilmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız böbrek hücre kültürü sistemi, ksenobiyotiklerin vücuttan atılmasını ve toksisitesini göstermesi açısından ideal bir organ kültürüdür [111].

Yapılan çalışmalar, klorpirifos'un sebep olduğu toksisitenin klinik belirtilerinin doza bağlı olarak maruziyetten sonra birkaç hafta sürebileceğini ancak klorpirifos'un büyük kısmının 48 -72 saat içinde vücuttan atıldığını göstermektedir. Klorpirifos'un büyük bir kısmı vücuttan kısa sürede atılabilse de klorpirifos alındıktan sonra bağırsaklardan hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçip tüm vücuda dağılabilmekte ve çoğunlukla yağ dokusunda depolanabilmektedir [112]. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızı kontrol ile 24, 48 ve 72. saatte klorpirifos uygulamalarını takip eden gruplar üzerinde gerçekleştirdik.

Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içinde sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondrideki enzimatik sistemleri indükleyerek veya değiştirerek serbest radikalleri meydana getirirler. Hücreyi koruyan enzimatik olan veya enzimatik olmayan sistemleri inhibe ederler. Hücrede oksidatif hasar meydana getirerek lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı ya da protein değişikliklerini başlatırlar. Bu durumlar ise azalmış intrasellüler kalsiyum ve pH değişiklikleri ya da hücre ölümü gibi hücresel fonksiyon değişikliklerine neden olabilir [113]. Klorpirifos'un serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı ve oksidatif doku hasarlarına yol açtığı belirtilmiştir. Meydana gelen yeni radikallerin ise makro moleküllere etki ederek lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaksiyonları başlattığı bilinmektedir [5]. Yapılan çalışmalarda, organofosfat uygulanan deney gruplarının böbrek, beyin, karaciğer, tiroid, gibi farklı doku örneklerinde lipit peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit düzeyinde artış olduğu ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerinde değişiklikler olduğu tespit edilmiştir [113]. Bütün bu çalışmalarda hasar mekanizmasının hücre membranı etkilenmesiyle gerçekleştiği ifade edilmektedir. Sağlıklı hücre kültür ortamında bu organofosfatın davranışının invivo ortamdaki davranışını ne kadar yansıtabileceği düşüncesi de bu çalışmamızın temel dayanaklarından biri olmuştur.

Doku örnekleri üzerinde çokça çalışılan ve zararlı etkileri bilinen organofosfatlı insektisitler ve özellikle klorpirifosun hücre kültürleri üzerine etkilerini gösteren çalışmalar çok yaygın değildir. hNS1(insan sinir kök hücreleri) hücreleri ile yapılan bir çalışmada, klorpirifosun yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli maruziyeti sonucu hücre ölümü seviyelerinde artış ve toksik etki tespit edilerek sitotoksisite bulgularına rastlanmıştır [114].

Gertie ve ark. klorpirifos' un alveolar epitel hücrelerinin ve T-lenfositlerin canlılığı üzerine yaptıkları bir çalışmada klorpirifosun hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. 10 µg/mL aralığında, 28 µg/mL klorpirifos'a karşılık gelen maksimum organofosfat pestisit seviyelerinin, mesleki maruziyet yoluyla insan serum örneklerinde de gözlemlendiğini ileri sürmüşlerdir [115]. Biz çalışmamızda klorpirifosun 10, 30, 60 ve 90 µg/mL'lik dozlarını düşük doz ve yüksek doz olacak şekilde ve farklı sürelerde uygulayarak hücre canlılığı üzerine etkisini gözlemlemeye çalıştık.

Gertie ve ark. çalışmalarında kullandıkları konsantrasyonların aralığında olan 30 µg/mL klorpirifos bizim çalışmamızda da sitotoksik etkiler göstermiştir ve hücre ölümleri görülmüştür. Ayrıca doz artışı ile birlikte hücre ölüm hızının ve ölen hücre sayısının kontrol ve daha düşük doz klorpirifos uygulanan gruplara göre arttığı görülmüştür. Doza bağlı hücre ölümündeki artış deney gruplarımızın hepsinde tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.16). Klorpirifos'un HEK293 hücrelerine etkisini araştırmak için 10, 30, 60 ve 90 µg/mL klorpirifos uyguladığımız ve 24 saat inkübe ettiğimiz hücrelerin MTT yöntemiyle elde ettiğimiz % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiğinde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığının azaldığını gördük. Toksik özellikte olduğunu bildiğimiz klorpirifosun, dozu arttıkça hücre canlılığında % 44,24'e kadar azalma meydana getirdiği görüldü (Şekil 4.1). 48 saatlik uygulama sonrası hücre canlılığında azalma % 48,57'ye kadar düştü (Şekil 4.2). 72 saat inkübe ettiğimiz 10, 30, 60 ve 90 µg/mL klorpirifos uyguladığımız HEK293 hücrelerinin hücre canlılığında ise % 46,37'ye kadar düştü (Şekil 4.3).

Klorpirifos'un HEK293 hücreleri üzerinde artan konsantrasyonları sonucu hücre canlılığına etkisinin zamana bağlı değişim grafiğine baktığımızda 24 saat inkübe edilen hücrelerde hücre canlılığının 48 saat inkübe edilen hücrelerdeki canlılığa göre biraz daha az olduğunu gördük (Şekil 4.4). Yapılan çalışmalar, klorpirifos'un sebep olduğu toksisitenin klinik belirtilerinin klorpirifosa maruziyet sonrası büyük kısmının 48 saat içinde vücuttan atıldığını göstermektedir ancak toksik etkilerinin devam edebileceği belirtilmiştir [112]. Biz de çalışmamızda 72 saat için toksik etkilerin hala devam ettiğini ve hücre canlılığında azalma

olduğunu gördük (Şekil 4.4). Klorpirifos'un HEK293 hücrelerine etkisinin xCELLigence yöntemiyle elde edilen bulgularına baktığımızda, zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalmanın MTT analiz sonuçlarını destekler yönde hareket ettiğini tespit ettik (Şekil 4.16).

Nöronal hücrelerin kullanıldığı bir in vitro çalışma ile benzer konsantrasyonlarda klorpirifos ve diazinon kullanılmış başka bir çalışma kıyaslandığında, bir çalışmada kullanılan ve sitotoksik etki görülen seviyelerin yaklaşık 10 katı daha düşük seviyelerde bile sitotoksik etkinin görülebileceği ifade edilmiştir. Bu durum sonuçların kullanılan hücre tipine veya sitotoksisiteyi analiz etmek için kullanılan yönteme bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği sonucunu açığa çıkarmaktadır. Tirelli ve ark. (2006), in vitro test sistemlerinde 250 μM klorpirifos kullanırken önemli bir sitotoksisiteye rastlamamışlardır, oysa bu konsantrasyon bağırsak bariyer bütünlüğünü değiştiren bir konsantrasyon olarak bilinmektedir. Sitotoksisite gibi parametrelerin, kullanılan hücre tipine ve test sistemine büyük ölçüde bağlı olduğunu göstermektedir [115, 116].

Biz çalışmamızda hücre canlılığını tespit edebilmek için en çok bilinen yöntemlerden MTT canlılık analizi yöntemi ve empedans ölçümü esaslı, otomatik bir ölçüm yöntemi olan xCELLigence analiz yöntemini kullandık. Klorpirifos dozlarının hücre canlılığına etkisini değerlendirmek açısından bakıldığında, her iki yöntemle elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görüldü (Şekil 4.16). Aynı çalışma sürecinde hücrelerin ışık mikroskobu ile görüntülenmesi sonucu elde ettiğimiz veriler, hücre canlılığında yüksek dozun olumsuz etkilerini açıkça gösterir yönde sonuçlar vermiştir (Şekil 4.5).

In vivo ve in vitro deneysel çalışmalar, kronik ve akut organofosfat uygulamaları sonucu oluşan nörotoksisite, hepatotoksisite, genetik toksisite, immünotoksisite, embriyotoksisite vb. toksik etkilerin patogenezinde oksidatif doku hasarının olduğunu göstermiştir. In vivo çalışmalar ve hücre kültürü çalışmaları uyumlu sonuçlar vermiştir. 1999 yılında Das ve Barone çalışmalarında klorprifosun PC12 (nöroendokrin hücre hattı) hücre hattında nörit uzamasını asetilkolinesteraz inhibisyonu olmadan da inhibe ettiğini belirtmişlerdir [113].

Organofosfatlı pestisitlere maruziyetin biyolojik olarak izlenmesi genellikle pestisitin serum seviyelerinin, metabolitinin veya asetilkolinesteraz aktivitesinin ölçümüne dayanır. Yu-Jie Liang ve ark. yaptıkları çalışmada organofatlı bir pestisit olan klorpirifos maruziyetini

izlemek için vücut sıvılarının in vitro kültürlenmiş T24 hücresi (Mesane kanseri hücresi), HT-29 hücresi (kolon kanseri hücresi) ve Jurkat (İnsan T lenfosit hücreleri) hücrelerine karşı sitotoksisitesini ölçmüşlerdir ve sonuçta vücut sıvılarının kültürlenmiş hücrelere sitotoksisitesinin, test edilen hayvanlara uygulanan klorpirifos dozunu güvenilir bir şekilde yansıttığını belirlemişlerdir [117]. Bu sonuç klorpirifosun toksisitesinin vücut sıvıları, popülasyondaki metaboliti ya da asetilkolinesteraz aktivitesi gibi farklı ölçümlerle ve aynı zamanda hem in vitro hem de in vivo araştırmalarda belirlenebileceğini göstermektedir. Hücre kültürleri ve denekler üzerinde yapılan çalışmaların toksisite belirlemede paralel yönde hareket ettiği anlaşılmaktadır.

Oositler, embriyolar, yumurtalar, sinir sistemi hücreleri, tiroid, periferik kan lenfositleri, mezenkimal kök hücreler ve karaciğer hücreleri üzerinde yapılan birkaç araştırma olmasına rağmen klorpirifosun sağlıklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri hakkında çok sayıda literatür verisi bulunmamaktadır. Bazı in vivo çalışmalar, klorpirifosun uzun süreli maruziyetten sonra karaciğere ve böbreklere zarar verebileceğini de göstermiştir. Klorpirifosun memeli karaciğeri Hepa 1c1c7, WB-F344 (sıçan hepatik oval hücre hattı) ve RK13 (Normal tavşan böbrek epitel hücresi) hücrelerinin in vitro proliferasyonunu hücre tahribatı olmadan önemli ölçüde baskıladığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca araştırma sonuçları, klorpirifos maruziyetinin hücre proliferasyonu ve hücre zarı hasarında türe ve hücre tipine bağlı bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Böbrek ve karaciğer hücre kültürlerinin, klorpirifos gibi organofosfatlı insektisitlerin hayvanlar üzerinde in vivo toksisite etkisini test etmeden önce taramasında tamamlayıcı bir araç olarak yararlı olabileceğini göstermiştir [111].

Kimyasallar bir organizma tarafından dolaşımda emildikten ve organlara dağıtıldıktan sonra, metabolize olurlar ve vücuttan atılırlar. Klorpirifosun vücuda alındıktan sonraki reaksiyonlar sırasında açığa çıkan bir metabolit olan TCP, klorpirifos'a maruz kaldıklarında genellikle insan ve diğer hayvanların idrar, kan ve diğer vücut sıvılarında tespit edilir. Bu nedenle TCP maddesi klorpirifos maruziyetinin bir biyolojik belirteci olarak kullanılabilir. Bu durum bize, maruz kalan hayvanlardan alınan vücut sıvılarının sitotoksisitesinin, yalnızca klorpirifosun kendisinden değil, aynı zamanda metabolitlerinin varlığından da kaynaklandığını göstermektedir. Farklı seviyelerde klorpirifos ve metabolit TCP, klorpirifosa maruz kalan sıçanların idrar ve serumlarında bulunmuştur. İdrar materyali, elde edilmesi ve işlenmesi kolay olduğu için, non-invaziv tanı ve izleme için uygun materyallerden biridir [117]. Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmaya göre oral maruziyeti takiben, sıçanlar

sindirilen klorpirifosun %90'ını idrar yoluyla ve %10'unu dışkıyla atmıştır [111]. Mesane ve böbrekler, idrarı depolamak için ana organlar olduğundan, klorpirifosun etkisinin mesane ve böbrek dokusundan türetilen hücreler üzerinde çalışılmasının daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. TCP'nin daha çok idrarda tespit edilmesi de bizlere böbreklerin bu toksititeden daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Bu nedenlerle çalışmamızda klorpirifosun etkisini gözlemleyebilmek için insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK293'ü kullandık. Az sayıda olmakla birlikte yapılan bir çalışmada HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca klorpirifos'un farklı dozlarına (0-90 μg/mL) maruz bırakıldığında hücre canlılığında azalma olduğu görülmüştür [112]. Bizim sonuçlarımız da 24 saatlik sürede ve farklı dozlarda uyguladığımız klorpirifosun hücre canlılığını azalttığını göstermiştir.

Çok sayıda biyoaktif bitkisel biyomoleküller arasında, polifenoller her zaman faydalı özellikleri göz önünde bulundurularak odak noktası olmaya devam etmektedir. Sağlığa yararlı bir aile olarak tanımlanan polifenollerin, antikanser, antimutajenik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiseptik ve antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir [77]. Tannik asit, benzersiz biyokimyasal özellikleri nedeniyle biyoloji ve medikal araştırma alanlarında son on yılda popülerlik kazanmış, doğal olarak oluşan bir antioksidan polifenoldür. Kullanımının temeli, birçok hidroksil grubu, proteinler ve diğer biyomoleküllerle bağlar özellikle hidrojen bağları oluşturmaya yönelik afinitesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tannik asit ile yapılan çalışmalar, birçok yeni farmasötik ve biyomedikal uygulamanın geliştirilmesine yol açmıştır.

Tannik asitin bir antioksidan olarak iltihabı azalttığı, yaygın patojenik bakteride bir antibiyotik görevi gördüğü ve çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Tannik asit biyomalzeme araştırmalarında, doğal ve sentetik hidrojellerin ve polimerlerin mekanik özelliklerini iyileştirmek için doğal bir çapraz bağlama maddesi olarak kullanılırken, aynı zamanda malzemelere de antiinflamatuar, antibakteriyel ve antikanser aktivite kazandırır [73]. Tannik asitin en önemli özelliklerinden biri de metal iyonlarını şelatlama yeteneğidir. Tannik asitin demir dışında bakır, kurşun, çinko, kadmiyum ve manganez gibi metal iyonlarıyla kompleks oluşturduğu da bilinmektedir. Yanıklara uygulandığında, yanmış doku tarafından oluşan toksik organik moleküllere bağlanır ve bunları çökeltir. 1920'lerde tannik asit tedavilerinin başlamasından sonra yanık olaylarına bağlı ölüm oranı %35,2'den %11,8'e düştüğü bildirilmiştir [73]. Çok farklı alanlarda faydalı kullanımının olması ve özellikle de

sağlık alanında ifade edilen olumlu katkıları nedeniyle, TA ile in vitro bir modelde araştırma yaparak literatüre yeni katkılar sunabileceğimizi düşündük.

Tanenlerin antioksidan özellikte olduğu bilinmekle birlikte, aynı yapı üzerinde hem antioksidan hem de prooksidan özellikler gösterebilmektedir (Şekil 2.7). Tanenler, serbest radikali kabul edici gibi davranıp oksidasyonun oluşumunu daha başlama aşamasındayken engellerler, ayrıca çok iyi hidrojen verici olmaları sebebiyle de, antioksidan özellik gösterebilirler. Aynı şekilde TA ile ilişkili antioksidan mekanizmalar da belirsiz bir durumu işaret etmektedir. Örneğin, TA prooksidan olarak işlev görebilir, geçiş metallerinin varlığında DNA hasarını indükleyebilir veya baskılayıcı hidroksil radikal üretimi gibi antioksidan özellik gösterebilir [77]. TA'nın hidroksil radikal oluşumuna karşı bir antioksidan olarak hareket ettiği veya kromatindeki bakır iyonlarını bağlayarak ve DNA'ya zarar vermek suretiyle bir prooksidan olarak hareket ettiği gösterilmiştir [73].

Tannik asitin diğer polifenoller yanında güçlü bir antioksidan olduğu ve antioksidan savunma sistemlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, hem antioksidan hem de prooksidan özellikleri sayesinde hem sitoprotektif hem de sitotoksik özellikler gösterdiği ileri sürülmüştür [77]. Bu alandaki çalışmalar TA'nın daha düşük konsantrasyonlarının pozitif bir antioksidan etkiye sahipken, yüksek konsantrasyonlarının oksidasyonu artıran bir prooksidan görevi gördüğünü göstermiştir [118].

Tannik asitin belli bir doz artışından sonra toksik olabileceğini ve prooksidan özellik gösterebileceğini çalışmamızda tannik asit dozunu artırdığımızda azalmış hücre canlılığı ile ifade edebileceğimizi düşünmekteyiz (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8.). TA'nın antioksidan mı yoksa oksidasyonu artıran bir prooksidan gibi mi davrandığı tamamen konsantrasyonla ilişkilidir. TA'nın farklı konsantrasyonlarda antioksidan ve prooksidan özelliğe sahip oluşu her iki durum için de TA'nın olumlu katkısı olduğunu gösterir çünkü prooksidan özelliği ile oksidatif stresi indükleme ve metal iyonlarını bağlama yeteneğine sahip olup antibakteriyel ve antikanser özellik gösterir [93, 95, 119-121]. Bizim çalışma bulgularımıza göre 10 µM'lık tannik asit dozunun sitoprotektif etkinin en çok görüldüğü doz olduğunu söyleyebiliriz. 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarımızda, doz artışı ile birlikte hücre canlılığında TA uygulanmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olmuştur. TA'nın yüksek dozlarının literatürlerde de ifade edildiği şekliyle prooksidan özelliği ile hücre canlılığını olumsuz yönde etkilediğini ifade edebiliriz. Yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında bir azalma

görmemiz ise tannik asitin prooksidan özelliğine işaret edebilir. Bu sonuçlar sağlıklı hücre hatları ile ilerde yapılacak olan çalışmalara ışık tutabilecek niteliktedir.

Polifenoller, yaşam boyu kanser riskini azaltan diyet antioksidanları olarak bilinmektedirler. Günlük diyetle polifenol alımı faydalı olarak kabul edilirken, mevcut araştırmalar, belirli polifenollerin tek başına veya kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde alınmasının hücresel düzeyde güçlü antikanser aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Tannik asit gibi birçok hidroksil grubuna sahip polifenoller, metal iyonlarını şelatlama yeteneğine sahiptir. Bakır iyonları da kromatinde bulunur ve çeşitli kanser tümörlerinde yüksek hücresel bakır seviyeleri görülür. Serbest bakır iyonları redoks aktiftir ve yüksek bir DNA bağlanma afinitesine sahiptir. Tannik asit kanser hücrelerinde bakır kompleksleri ve reaktif oksijen türleri oluşturarak DNA'yı bağlayıp hücre bütünlüğünü bozmak suretiyle hücre ölümüne neden olur [103].

Kanser hücreleri üzerinde tannik asitin anti-proliferatif yani çoğalmayı önleyici etkilerini gösteren birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, normal hücre kültürleri üzerinde yapılan araştırmalar henüz çok aydınlatılmamış bir alan olarak görülmektedir. Bu nedenle, bu çalışmamızda polifenollerin bilinen güçlü antioksidan ve antikanserojen özelliklerinden yola çıkarak, tannik asitin sağlıklı hücreler üzerinde sitoproliferatif etkisinin olup olmadığının araştırmayı amaçladık. HEK-293 hücreleri, in vitro kültürlenen insan embriyonik böbreklerinden elde edilen spesifik bir hücre hattıdır. Vücudun toksik bileşenlere filtre sistemi olarak böbreğin işlevselliğinin yanısıra, HEK-293 hücreleri güvenilir büyüme ve değişime uyum sağlama eğilimi gösterdikleri için de çalışmaya özgün ve uygun bir hücre hattıdır.

Polifenoller, hayvan modellerinde tümör oluşumu inhibisyonunu hücre çoğalmasını engelleme yoluyla göstermişlerdir. Epigallocatechin gallate ve tannik asit dahil olmak üzere yeşil çay polifenolleri, farelerde benzo[a]pirendiolepoksite (BPDE) adı verilen cilt tümörijenik yanıtına karşı koruma ve ayrıca 7,12-dimetil-1 tarafından indüklenen cilt kanseri ilerlemesini de azaltma yönünde etki göstermişlerdir [73].

Yapılan araştırmalarda bazı hayvan hücrelerinde tannik asitin kanseri önleyen kimyasal madde olarak kullanıldığı da gösterilmiştir. UV-GB (Ultraviyole-Görünür Bölge) radyasyona maruz kalan tüysüz farelerde yapılan çalışmada, tannik asitin farelerde meydana gelen cilt tümörünün ilerlemesini yaklaşık %70 oranında baskıladığı belirtilmiştir [69,122].

Meme kanser hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda ve saatlerde tannik asit uygulanmış, immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak bu hücrelerdeki pro-apoptotik Bax protein yüzdesi belirlenmiş ve sonuçta tannik asitin Bax proteinini artırıp meme kanseri hücrelerinin ise apoptoza gitmesini sağladığı düşünülmüştür [85,123].

Tannik asitin karsinojenezi önlemeye ek olarak prostat, meme, ağız ve boğaz, karaciğer, kolon ve glioma kanser hücre dizilerinde çoğalmayı azalttığı ve spesifik olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir [124 -130]. Polifenollerin kanser önleme mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte prooksidan aktiviteye bağlı olabileceği de ileri sürülmektedir. Polifenollerin antioksidan özelliklerinin varlığı, kanserle ilişkili gen ekspresyonu, kanserli hücre sinyalizasyonu ve hücre döngüsündeki değişiklikler üzerine olan etkileri içeren özellikleri antikanser aktiviteyi açıklamak için kullanılan yollardandır [101].

Tannik asit elektrostatik etkileşimi, hidrojen bağı kurabilme özelliği ve hidrofobik etkiler oluşturması sebebiyle, yağ asidi sentezini inhibe edebilir ve emilimi önlemek için lipidlere bağlanarak çoğalan kanser hücrelerini etkin bir şekilde aç bırakabilir [69,126,131]. Polifenollerin antikanser etkisi prooksidan aktiviteye bağlı oluşuyla ilişkilendirilmiştir [73]. Biz de çalışmamızda polifenol özelliğe sahip olan tannik asitin, insan embriyonik böbrek hücresi üzerinde, yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde öldürücü etkiye sahip olduğunu tespit ettik.

Bir maddenin doğasının, ortamına bağlı olarak prooksidan veya antioksidan olabileceği ileri sürülse de, tannik asitin antioksidan etkisinin daha fazla araştırılması gereklidir. Tannik asitin diyetle dikkatli alınmadığında sağlığı bozan kimyasal bir toksik olabileceği ifade edilmektedir. Bu nedenle, gıda ve çevresel analizlerde tannik asiti değerlendirmek için farklı yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir [77].

Çalışmamızın temel hedeflerinden biri tannik asitin hücre canlılığına etkisini en çok bilinen ve kullanılan MTT analizi yanında empedans değişimi esaslı olan xCELLigence yani ortalama gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi ile de görmekti. Yöntemler arasında tannik asit etkinliğini değerlendirmede hücre çoğalmasını olumlu yönde etkileyen dozların her iki yöntemde de aynı dozlar (10µM) olduğunu tespit ettik. 20 µM ve 25 µM yüksek doz tannik asit uyguladığımız gruplarda her iki yöntemde de hücre canlılığının kontrole göre anlamlı olarak azaldığını bulduk. Hücre canlılığındaki değişimleri ışık mikroskobu ile görüntülediğimizde ise sayısal verilere paralel yönde değişimler olduğunu gözlemledik (Şekil

4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.10, Şekil 4.17) Kullanılan farklı yöntemlerin sonuçlarının birbirini destekler nitelikte olduğunu söyleyebiliriz.

2019 yılında HEK293 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada tannik asit uygulanması sonrasında hücre canlılığının başlangıç konsantrasyonlarında hafif bir düşüş gösterdiği belirtilmiştir [77]. Bizim çalışmamızda ise gruplarda % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiğine göre (Şekil 4.6, Şekil 4.7) 5 µM'da çok hafif bir düşüş yaşanmıştır. Hücre canlılığı en düşük %38,88 olup, en yüksek canlılık ise %133,33 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada düşük doz tannik asitin canlılığı artırıcı, yüksek doz tannik asitin ise canlılığı azaltıcı özelliği olduğunu söyleyebiliriz.

Tannik asitin yeni antikanser ajanları ve kombinasyon tedavileri için umut verici bir aday olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır [132]. Bu çalışmalar, tannik asitin apoptotik kaskadları başlatan ve kanser hücrelerinde DNA'ya zarar vermek için ROS üreten çeşitli hücre ölümü uyarıcı kaynakları yarattığını göstermiştir. Tannik asit bazı tıbbi durumları doğrudan tedavi etmek veya önlemek için kullanılabilirken, daha fazla araştırma ile ek farmasötik uygulamaların geliştirilmesine katkıda bulunabilecek özelliklere sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmada elde ettiğimiz verilerin, hücre kültürleri üzerine eklenebilecek antioksidan maddeler ile eser ve esansiyel elementlerin hücre canlılığına olan etkisinin anlaşılabilmesinde faydalı olacağını düşünmekteyiz. Tannik asit ve polimer zincirler arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri yoluyla elastik modülü, sıkıştırma mukavemetini, gerilme mukavemetini ve yapışmayı artırır, dolayısıyla membran bütünlüğü hakkında bilgiler verebilir [73]. Tannik asitin sağlıklı hücre kültür ortamında çalışılmasının hücre canlılığı üzerine dolayısıyla hücre membranına olan etkisinin gözlemlenmesi açısından uygun olacağı kanatindeyiz. Tannik asitin biyomateryallerden kontrollü salınımı da mümkündür ve bu biyomateryallere eklendiğinde anti-inflamatuar, antibakteriyel ve antikanser etkiler yaratır. Yara iyileştirici hidrojel malzemelerinde, tannik asitin dahil edilmesinin yapışmayı, hemostazı iyileştirdiği ve iltihaplanmayı önlediği bulunmuştur. Tannik asit birçok yüzeyde tek tabaka halinde adsorbe olur ve proteinleri bağlama ve metal iyonlarını şelatlama yeteneği ile birleştiğinde çok işlevli ince film kaplamalar oluşturulabilir. Biyomedikal ve biyomalzeme araştırmaları alanında vazgeçilmez olduğu kanıtlanabilecek şaşırtıcı bir potansiyel uygulama yelpazesine sahiptir. Bu alanlarda uygulamaların yapılabilmesi için sağlıklı hücre kültürü ortamlarında tannik asitin etkinliği çalışmalarının yapılması, hücre canlılığının en etkin

olduğu dozların belirlenmesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz IC_{50} değerlerinin bu alanlardaki çalışmalar için önemli katkılar sağladığını düşünmekteyiz.

Çalışmalar, Tannik asitin kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkiler gösterdiğini yani kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatıcı etkide olduğunu ortaya çıkarmıştır, ancak normal hücre hatları üzerinde yapılan araştırmalar henüz keşfedilmemiş bir alan olarak durmaktadır [77]. Tannik asitin kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek antioksidan özellik sergilediği yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır. Ancak normal hücrelere uygulanan tannik asitin nasıl bir özellik sergileyeceği bizim için merak konusuydu. Çalışmamızda kanser hücresi değil de normal insan embriyonik böbrek hücre hattını (HEK293) kullanarak 24, 48 ve 72 saat süre ile 5, 10, 15, 20 ve 25 μM tannik asit dozunun IC_{50} değerlerini ve canlılığa etkilerini belirledik. 10 μM'a kadar eklenen tannik asitin olası antioksidan özellik ile hücre canlılığına olumlu katkı sağladığını ve tüm çalışma gruplarında 20 ve 25 μM uygulanan tannik asit dozlarının ise hücre canlılığının azaltarak pro-oksidan etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Bu da literatür araştırmasında olduğu gibi tanenlerin hem antioksidan hem de prooksidan özellikte olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 2.9).

Polifenoller üzerinde yapılan çoğu araştırma in vitro kanser hücre hatlarını hedeflerken, normal hücre hatları ve in vivo modeller üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi de zorunludur. İnsanlarda diyetle ilgili tannik asit tüketimi, dikkate alınması gereken araştırmalarda gri bir alan olmaya devam etmektedir. Güvenli ve toksik seviyelerinin farkında olması gerektiğinden, bu terapötik kullanım için zorunludur. Bu başarılırsa, tannik asit belirli koşulları ve hastalıkları hafifletmenin ön saflarında olabilecektir.

Zn, canlılığın sürdürülmesinde hücre bölünmesinde, apoptozda ve hücre içi haberleşme olayında büyük öneme sahiptir. İn vitro ve in vivo çalışmalar çinko eksikliğinin oksidatif stres ile bağlantılı olduğunu göstermektedir [54]. Zn, canlı organizmalarda hücre farklılaşması, hücre bölünmesi ve gelişimi gibi birçok fizyolojik fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli bir esansiyel elementtir ve bu nedenle vücutta çinko yetersizliği beyin, akciğer, kalp ve böbrek gibi birçok organın gelişimini ve fonksiyonunu etkileyebilir. Yapılan araştırmalara göre çinko yetersizliği, böbrek, karaciğer, testis, timüs, deri gibi farklı organlarda, farklı düzeylerde apoptoz ile hücre ölümünde artışa yol açabilir [133-137].

Canlılardaki büyüme, gelişme olayları için gerekli olan ve antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak bulunan Zn, canlılığın devamında hücre bölünmesinde, apoptozda ve hücre

içi haberleşme olayında çok büyük öneme sahiptir [138]. İnsanlar, deney hayvanları ve hücre kültürü çalışmaları Zn eksikliğinin oksidatif stresin düzenlenmesi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Zn, oksidatif strese karşı koruyucu etki gösteren Cu/Zn, SOD ve metallotiyoninler gibi proteinlerin esansiyel bir kofaktörüdür [139].

Zn, membranların bütünlüğünü koruyup iyon kanallarının dayanıklılığını sağlamaktadır. Zn, redoks reaksiyonlarına katılmaz ve organizmada kararlı haldedir. Membran onarımında, hücresel homeostazın sağlanmasında, hücrenin serbest radikallere karşı korunmasında, hücre çoğalmasında, gen ekspresyonunda ve apoptozun engellenmesinde görevlidirler [140-144].

Zn homeostazındaki değişikliklerin hücrenin apoptoza duyarlılığını etkileyebildiği belirtilmiştir. Çinko'nun hücre ölümlerinin azaltılmasındaki rolü ve önemi; antioksidan özelliğine sahip olmasından ve metallotiyonin (MT) ekspresyonunda belirgin bir artışa yol açması ile de açıklanmaktadır. Araştırmalarda böbrek dokusunda çinko ve çinko ile indüklenen MT'in farklı koşullarda oksidatif stres sonucu meydana gelen böbrek hasarına karşı bir koruma sağladığı belirtilmiştir [145-148]. Zn farklı dokulara çeşitli taşıyıcı proteinler ile taşınır. Gastrointestinal sistemden Zn'nun absorbsiyonu ZIP-4 proteinleri ile sağlanırken, ZnT-1 ince barsak hücrelerinde, ZnT-2 böbrek, barsak, ve testislerde, ZnT-3 ise beyinde ve testislerde görev almaktadır. Böbrekler çinko'nun absorbsiyonu ve atılımında önemli bir role sahip organlardandır. Zn'nin vücuttan atılımının %70'i dışkı ile, bir miktarı da idrar ve ter yoluyla olmaktadır [54]. Biz de çalışmamızda literatür bilgileri ışığında insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) üzerinde farklı dozlarda uygulanan Çinko Oksit'in hücre çoğalmasına ve canlılığına olabilecek etkisini görmeyi amaçladık.

Yapılan bir çalışmada sağlıklı insanlarda, 8 günden uzun süreyle normalden beş kat daha fazla miktarda çinko verilmesinin kemotaksi ve fagositozda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir [149,150]. Çinko uygulaması yaklaşık 15 gün uzatılırsa hücre proliferasyonunun da azaldığı bildirilmiştir [151]. Çinko, protein üçüncül yapılarını stabilize eder ve işlevlerini değiştirebilir. RNA ve DNA polimerazlara katılır ve G1/S geçişi sırasında gereklidir. Bu etkiler hücresel çoğalma düzenlemesine çinkonun önemini vurgular [152-154].

Çinko Oksit'in doza bağlı etkisinde MTT metodunu kullanarak hücre canlılığı analizi sonuçlarını incelediğimizde 25, 50, 75, 100 ve 150 μM uygulanan Çinko Oksit'in 24 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiğine göre artan Çinko Oksit konsantrasyonlarında hücre

canlılığında artış olduğu görülmektedir. Özellikle 75 µM çinko uygulamasından sonra hücre canlılığında belirgin bir artış olmuştur ve hücre canlılığı % 128,5'e kadar çıkmıştır (Şekil 4.11). Çinko Oksit'in 25, 50, 75, 100 ve 150 µM uygulanan dozlarının 48 saatlik inkübasyonu sonucu % hücre canlılığı doz artışıyla birlikte artış göstermiş ve hücre canlılığı % 137,36'ya kadar çıkmıştır (Şekil 4.12).

HEK293 hücrelerine uygulanan çinko oksit, süre arttıkça yani 72 saat inkübe edilmesi sonucu hücre canlılığında çok daha büyük bir artış görülmüştür ve bu oran %235,55'e kadar çıkmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuç ise bizlere HEK293 hücrelerinde çinko oksitin hücre canlılığının artmasına olumlu yönde katkı sağladığını gösterir (Şekil 4.13).

Çinko Oksit dozlarının hücre canlılığına etkisinin süreye bağlı olarak değişimine baktığımızda da 72 saat inkübe edilen hücrelerin hücre canlılığının 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelere göre daha fazla olduğunu görmekteyiz (Şekil 4.14). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, farklı çinko dozları ile gözlenen etkilerin hücrelerin çinko oksite maruz kalma sürelerine göre de değişiklik gösterebileceğini açığa çıkarmıştır. HEK293 hücrelerinde xCELLigence analiz sonuçları da kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarında Çinko Oksit'in hücre proliferasyonunu artırdığını göstermektedir (Şekil 4.18).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klorpirifos, tannik asit ve Çinko Oksit'in insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK293 hücre hattında süre ve doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine olan etkisini incelediğimiz çalışmamızda; organofosfatlı bir insektisit olan klorpirifosun hücre canlılığını azalttığını gözlemledik. Doz artışının canlılığı azaltmada etkili bir faktör olduğunu söyleyebiliriz. Tannik asitin 10µM olarak uygulanan dozunun HEK293 hücrelerinde hücre canlılığını artırmada etkili olduğunu ve yüksek dozlarda uygulanan tannik asitin ise hücre canlılığını azalttığını tespit ettik. Çinko Oksit uyguladığımız dozların gruplara etkisine bakıldığında bu tür canlılık analizi yapılmak istenen çalışmalarda daha yüksek dozların kullanılmasının gerekliliği görülmüştür. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasalların etkilerinin uygulanan doz ve süre ile değişkenlik gösterdiği bizim bulgularımızla da açıkça görülmektedir.

Çalışmamızda farklı dozlarda klorpirifos ve tannik asit uygulamalarında, hücrelerin %50'sinin öldüğü inhibitör konsantrasyon olan IC_{50} değerleri de belirlenmiştir. Literatürde Tannik asit ve Çinko Oksit'in uygulama süresine ve doza bağlı olarak hücre canlılığında artış ve azalışlar göstermesinin onların antioksidan ve prooksidan özelliklere sahip olmalarından kaynaklandığı ifade edilmektedir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilerin ileride hücre kültürü ortamında yapılacak sitoprotektif çalışmalara ve ayrıca hücre kültürlerinde oksidatif stres ve antioksidan parametrelerini içeren çalışmalara da ışık tutacağı kanısındayız. Çalışmamızda kullandığımız farklı iki analiz yöntemi olan MTT ve xCELLigence yöntemlerinin sonuçlarının birbirini destekler yönde hareket ettiğini ifade edebiliriz.

KAYNAKLAR

[1]. Kurutaş, E.B., Kılınç, M. (2003). Pestisitlerin Biyolojik Sistemler Üzerine Etkisi. **12**, 215-228.

[2]. Vural, N. (2005). *Toksikoloji.* Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.

[3]. Sağmanlıgil, H. (1994). Tavuklarda İvermektin ve Klorprifosun Toksikolojik Etkileşim Özellikleri Üzerinde Deneysel Araştırmalar, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* **5 (1-2),** 65-84.

[4]. Türkmen, R., Özdemir, M. (2014). Klorprifos-Etil Uygulanan Diyabetli Ratlarda Likopenin Antioksidan ve Hipoglisemik Etkilerinin Araştırılması. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **8(1)**, 1-17.

[5]. Mercan, S., Eren, B., Dinç, N. (2017). Pestisit klorprifosun rat (wistar albino) karaciğerinde oluşturduğu hasar üzerine kurkuminin antioksidan etkisinin incelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi,* **32,** Erişim Tarihi 17.12.2020, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/275765.

[6]. Kayhan, F.E., Kaymak, G., Akbulut, C., Ertuğ, N.D. (2017). 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in Zebra Balığı (Danio rerio Hamilton, 1822) Solungaçlarında Antioksidan Enzimler ve Lipid Peroksidasyon Seviyesi Üzerine Akut Etkilerinin Belirlenmesi. *Trakya University Journal of Natural Sciences,* **18(2),** 143-148 Erişim Tarihi 17.12.2020, https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/352803.

[7]. Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Düzenli, S., Güney, K. Ve Kurt, F. (2004). *Çevre Kirliliği (Çevre Biyolojisi).* Ankara, Palme Yayıncılık.

[8]. Altıkat, A., Turan, T., Torun, F., Bingül, Z. (2009). Türkiye'de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* **40(2),** 87-92. Erişim Tarihi 24.12.2020, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/35339.

[9]. Miller, G.T, Spoolman, S. E. (2007). *Living in the Environment*. Belmont, USA. Erişim Tarihi 24.12.2020, http://www.mtcarmelacademy. net/uploads/1/1/7/5/11752808/living_in_the_environment_16th_edition_-_miller.pdf.

[10]. Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G. Tarımsal Savaşımda Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları. Erişim Tarihi 25.12.2020, https://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/dd7a04804967197_ek.pdf.

[11]. Kurt, B. (2017). Klorprifos Uygulanan Sıçanlarda Selenyumun Olası Koruyucu Etkisinin Hematolojik Parametreler, Oksidan Sistem ve Eser Element Düzeyleri Açısından İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. İstanbul.

[12]. Turhan, B. (2014). Karbendazim ve Klorpirifos' un Meyve ve Sebze Örneklerinde HPLC/FD ile Eş Zamanlı Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yozgat.

[13]. Taşpınar, E. (2019). Klorprifos Uygulanan HEK 293 Hücrelerinde Antioksidan Kullanımının Apoptoz ve Oksidan Sistem Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. İstanbul.

[14]. Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z. (1997). Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, Ankara, No:52. Erişim Tarihi 25.12.2020, https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/css52.pdf.

[15]. Alp, H., Karakuş, A., Çelik, M.M., Başarslan S.K. (2012). Organofosfat Zehirlenmesinde Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı: Fitoterapi. *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg.* **3,** 8–16. Erişim Tarihi 25.12.2020, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/183729.

[16]. Babayiğit, M.A., Tekbaş, Ö.F., Çetin, H. (2014). Public health effects of pesticides used in pest management and precautions for the protection. *TAF Preventive Medicine Bulletin,* **13(5),** 405–412. Erişim Tarihi 25.12.2020, https://www.researchgate.net/publication/275044333_Public_health_effects_of_pesticides_used_in_pest_management_and_precautions_for_the_protection.

[17]. Korkmaz, C., Ay, Ö., Temel, G., Erdem, C. (2020). Doğu Akdeniz Bölgesi'nden Avlanılan Balık Türlerinin Kas Dokularında Bazı Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi. **3(1)**, 10-19. Erişim Tarihi 02.01.2021. https://www.researchgate.net/publication/338936734_Dogu_Akdeniz_Bolgesi'nden_Avlanilan_Balik_Turlerinin_Kas_Dokularinda_Bazi_Pestisit_Kalintilarinin_Belirlenmesi.

[18]. Arslan, S., Çiçekgil, Z. (2018). Türkiye'de Tarım İlacı Kullanım Durumu ve Kullanım Öngörüsü. **4(1)**, 1-12. Erişim Tarihi 25.12.2020, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/498433.

[19]. Dinçel, A., Demli, F., Uzun, R., Alatan, F. (2008). Pestisit Zehirlenme Şüphesi ile Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına Gönderilen Numunelerin GS-MS ile Analizi. **65(1)**, 7-15. Erişim Tarihi 02.01.2021, https://www.journalagent.com/turkhijyen/pdfs/THDBD_65_1_7_15.pdf.

[20]. Tarım İlacı (Pestisit) Kullanımı. Türkiye Cumhuriyeti Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı. Erişim Tarihi 17.06.2022, https://cevreselgostergeler.csb.gov.tr/tarim-ilaci-pestisit-kullanimi-i-85834.

[21]. Bitki Sağlığı Uygulama Programı. (2021). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı ve Karantina Daire Başkanlığı. Ankara. Erişim Tarihi 17.06.2022, https://www.tarimorman. gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Bitki_Sagligi/Bitki_Sagligi_Uygulama_Kitaplari/2021_Bitki_Sagligi_Uygulama_Programi.pdf.

[22]. Arslan, S. (2016). Türkiye'de Pestisit Kullanımı ve Çevresel Etkileri. XII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü. Erişim Tarihi 02.01.2021, https://docplayer.biz.tr/50784835-Turkiye-de-pestisit-kullanimi-ve-cevresel-etkiler.html.

[23]. Akkaya, R., Gürel, Y., Koç, F., Yiğit, Y., Daş, Y.K., Yorulmaz, A., Karakurt, İ. (2005). Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne 2001-2002 Yılları Arasında Gönderilen Örneklerde Tespit Edilen Pestisidle Zehirlenme Vakaları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* **16,**1-2.

[24]. Ünal, H.H., Oruç, H.H., Sezgin, A., Kabil, E. (2010). Türkiye'de, 2006-2010 Yılları Arasında, Bal Arılarında Görülen Ölümler Sonrasında Tespit Edilen Pestisitler. *Uludağ Arıcılık Dergisi,* **10(4),**119-125. Erişim Tarihi 02.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/143500.

[25]. Demirözer, O., Uzun, A., Kurt, B., Nayir, T., Öztaş, D., Tercan, T. (2019). Ziraat Fakültesi Öğrencilerinin Pestisitler Hakkındaki Bilgi Düzeyleri. *ESTÜDAM Halk Sağlığı Dergisi,* **4(1),** 24-34. Erişim Tarihi 02.01.2021, https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/628523

[26]. Sataloğlu, N., Aydın, B., Turla, A. (2007). Pestisit Zehirlenmeleri. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni,* **6(3),** 169-174. Erişim Tarihi 02.01.2021, https://www.bibliomed.org/mnsfulltext/1/khb_006_03-169.pdf?1609607345.

[27]. Eren, B., Mercan, S., Dinç, N. (2017). Pestisit klorprifosun neden olduğu testis doku hasarı üzerine kurkuminin antioksidan etkisinin ışık mikroskobik olarak incelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi,* **32,** Erişim Tarihi 17.12.2020, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/275767.

[28]. Maruz, H. (2016). Hayvan Yemlerinde Pestisit Kalıntılarının Önemi ve Kontrolü. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics***, 2(2)**. Erişim Tarihi 16.01.2021, https://www.researchgate.net/profile/Habip_Muruz2/publication/320182963_The_importance_and_control_of_pesticides_residues_animal_feeds/links/5d0b8fb8299bf1f539d29456/The-importance-and-control-of-pesticides-residues-animal-feeds.pdf.

[29]. Tiryaki, O. (2016). Türkiye'de Yapılan Pestisit Kalıntı Analiz ve Çalışmaları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* **32(1),** 72-82. Erişim Tarihi 16.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/235971.

[30]. Özgün Ş., Yıldırım, E., Solmaz, A., Kireçci, M., Hüdayioğu, M.R. (2009). Bir Akut Pestisit İntoksikasyonu Salgını İncelemesi; Kahramanmaraş Vali Saim ÇOTUR Yatılı İlköğretim Bölge Okulu. *TAF Prev Med Bull,* **8(3),** 199-206. Erişim Tarihi 17.01.2021, https://docplayer.biz.tr/4218400-Bir-akut-pestisit-intoksikasyonu-salgini-incelemesi-kahramanmaras-vali-saim-cotur-yatili-ilkogretim-bolge-okulu-mayis-2008.html.

[31]. Bozkürk, B. Pestisitler: İlaç mı zehir mi? (02.10.2021). Deutsche Welle. Erişim Tarihi 23.06.2022, https://www.dw.com/tr/pestisitler-i%CC%87la%C3%A7-m%C4%B1-zehir-mi/a-59379359

[32]. Özcan, Z., Tongur, S. (2019). Pestisitlerin Toksisitesinin Lepidium Sativum Test Moduyla Çevre ve İnsan Sağlığı Açısından Değerlendirilmesi. *Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi*, **2(4),** 144 -150. Erişim Tarihi 18.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1107465.

[33]. Kayagil, İ., Baltacı, C. (2016). Bazı tetrasübstitüe-imidazo [1,2-a] pirazin Bileşiklerinin Tere (Lepidium Sati-vum L.) Tohumları Üzerindeki Herbisit Etkilerinin Araştırılması. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **7(2),** 157-160. Erişim Tarihi 18.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/267097.

[34]. Mengüç, Ç. (2018). Herbisit Toksisitesi ve Yabancı Otlara Karşı Alternatif Mücadele Stratejileri. *Turkish Journal Of Weed Science.* **21(1),** 61-73. Erişim Tarihi 18.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/626922.

[35]. Karahan, A., Kutlu, A.M., Karaca, İ. (2018). Thiacloprid'in, Anadolu Bal Arısı (Apis mellifera anatoliaca) ve Kafkas Bal Arısı (Apis mellifera causica)'nın Yaşam Sürelerine Etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi,* **5(3),** 245-252. Erişim Tarihi 19.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/514533.

[36]. Erdoğan, B. (2010). Samsun'da Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Sağlığa ve Çevreye Etkileri. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi,* **19 (2),** 28-35. Erişim Tarihi 20.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/26237.

[37]. Demirdöğen, B. (2010). Organofosfatlı Pestisit Zehirlenmeleri ve Serum Paraoksonaz 1 (PON1) Enziminin Organofosfat Metabolizmasındaki Rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi,* **67 (2),** 97-112. Erişim Tarihi 20.01.2021,

[38]. Türkmen, R. (2013). Klorprifos Uygulanan Diyabetli Ratlarda Likopenin Antioksidan ve Hipoglisemik Etkilerinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. Afyonkarahisar.

[39]. Gül, H. (2017). Türkiye'de Kullanılan Zirai İlaçların Sağlığa Etkileri. Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sağlık Yönetimi Anabilim Dalı. Nevşehir.

[40]. Uzun, F.G. (2012). Ratlarda Klorprifos'un Hepatotoksik Etkisi ve Kuersetin ve Kateşin'in Koruyucu Rolü. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara.

[41]. Drugs Affecting the Parasympathetic Nervous System and Autonomic Ganglia. (2016). Chapter 10. Erişim Tarihi 23.01.2021, https://basicmedicalkey.com/drugs-affecting-the-parasympathetic-nervous-system-and-autonomic-ganglia/.

[42]. Baş, H. (2010). Ratlarda Klorprifos'un Kardiyotoksik Etkisi ve Kuersetin ve Kateşin'in Koruyucu Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara.

[43]. Deveci, H.A., Karapehlivan, M., Kaya, İ., Kükürt, A., Alpay, M. (2015). Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Ankara*

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, **62,** 255-260. Erişim Tarihi 28.01.2021, http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/2000/20877.pdf.

[44]. Önder, S. (2018). Organofosfatlara Maruziyet Sonrasında Oluşan Protein Eklenti Ürünlerini Tanıyan Monoklonal Antikorun Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı. Ankara.

[45]. Ekmekyapar, F., Tosun, C., Ataçoğlu, I. (2014). Klorprifosun Daphnia Magna Kullanarak Toksisitesinin Araştırılması ve Çevresel Risk Değerlendirmesi. *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi,* **3(1),** 1-8. Erişim Tarihi 28.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/207838.

[46]. Yakar, Y. (2018). Çekirdeksiz Sofralık Üzümlerde Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi. *YYÜ TAR Bİ DERG,* **28(4),** 444-447. Erişim Tarihi 03.02.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/617230.

[47]. Ersoy, N., Tatlı, Ö., Özcan, S., Evcil E., Coşkun, L., Erdoğan, E., Keskin, G. (2011). Üzüm ve Çilekte Pestisit Kalıntılarının LC-MS/MS ve GC-MS ile Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi,* **25(2),**70-80. Erişim Tarihi 03.02.2021, http ://sjafs. selcuk.edu. tr/sjafs/article / view/207/122.

[48]. Patat, S., Akça, H., Kaleli, S., Karakoyun İ., Koçak A., Gültekin, F. (2003). Klorprifos-etil'in HEPG2 hücre dizilerinde hücre canlılığına etkisi ve melatoninin koruyucu etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **10(3),** 39-43. Erişim Tarihi 29.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/196528.

[49]. Çetinkaya, M.A. (2006). Etefon İle Klorprifos Etil'in Tek Ve Bir Arada Etkilerinin Rat Bağırsak Kasında In Vıtro Olarak Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. Ankara.

[50]. Deveci, H.A., Nur, G., Kırpık, M.A., Kükürt, A., Karapehlivan, M. (2016). Akut Klorprifos-Etil Toksikasyonunda Kafeik Asit Fenetil Esterin Total Sialik Asit, Nitrik Oksit ve Aminotransferaz Düzeylerine Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü dergisi,* **9(1),** 39-45. Erişim Tarihi 29.01.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/876002.

[51]. Çetin, N., Eraslan, G., Bilgili, A., Eşsiz, D. (2005). Tavşanlarda İçme Suyu ile Kronik Klorprifos Alımının Elektrokardiyogram Üzerine Etkisi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*

(Journal of Health Sciences), **14(3),** 177-183. Erişim Tarihi 04.02.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/692298.

[52]. Gürsoy, S., Gürsoy, O. (2017). Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler. *Akademik Gıda (Academic Food Journal),* **15 (4),** 426-435. Erişim Tarihi 05.02.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/390135.

[53]. Deveci, H.A., Kükürt, A., Nur, G., Kaya, İ. (2016). Cyprinus carpio (L. 1758)'da Klorprifos-Etil Uygulamasının Sialik Asit, Malondialdehit ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi. *Kafkas Üniversitesi Fen. Bil. Enst. Derg.* **9 (2),** 46-51. Erişim Tarihi 06.02.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/874079.

[54]. Özsobacı, N. (2016). Elektromanyetik Alan Uygulamasının (Wİ-Fİ 2.4 GHZ) İnsan Embriyonik Böbrek Hücrelerinde (HEK293) Apoptoz ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerine Selenyum ve Çinkonun Etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. İstanbul.

[55]. Nisari, M. (2005). Kayseri ve Yöresindeki Sağlıklı ve Preeklamptik Gebelerde Anne ve Kord Plazmasında Eser Element (Çinko, Bakır, Magnezyum) Düzeylerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı. Kayseri.

[56]. Deletioğlu, V. (2015). Çinko ve Selenyumun Antioksidan Özelliklerinin, Oksidatif Stres İndüklü DNA Radikallerinin İmmün-Spin Yakalama Yöntemi Kullanılarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. Ankara.

[57]. Yazgan, B., Yazgan, Y. (2016). Antioksidan redoks sistemi üzerinde metallotionin ve çinko ilişkisinin önemi. *SDÜ Tıp Fak Derg,* **23 (3),** 104-111. Erişim Tarihi 06.03.2021, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/282881.

[58]. Tatlı, O. (2015). İnorganik veya Organik Çinko Kapsayan Etlik Piliç Rasyonlarına Tannik Asit Katılmasının Performans ve Sindirilebilirlik Üzerine Etkisi. DoktoraTezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı. Aydın.

[59]. Ergün, D. (2018). Hipoksi ve Hiperkapninin İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Membranında (HEK293) TRPM2 Kanal Aktivitesine Etkisinin Patch Clamp Tekniği ve

Enzimatik Ölçümler ile Araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı. İstanbul.

[60]. Demiral, T., Tepebaşı M.Y., Calapoğlu, F., Bülbül, A., Calapoğlu, M. (2019). İn Vitro Çinko Uygulamasının DNA Hasarı, Lipid Peroksidasyonu ve Eritrosit Stabilitesi Üzerine Etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi,* **14 (2),** 316-326. Erişim Tarihi 06.03.2021, https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/865305.

[61]. Çinko Nedir? Hangi Besinlerde Bulunur? (2022). Özel Rumeli Hastanesi. Erişim Tarihi 25.06.2022,https://rumelihospital.com.tr/saglik-rehberi/beslenme-ve-diyet-saglik-rehberi/cinko-nedir-hangi-besinlerde-bulunur/.

[62]. Çinko içeren Çikolata, Çay ya da Kahve Oksidatif Stresi Azaltabilir. İnovatif Kimya Dergisi. (2018). Erişim Tarihi 06.03.2021, https://inovatifkimyadergisi.com/cinko-iceren-cikolata-cay.

[63]. Özmen, F. (2010). Ratlarda Klorprifos'un İnce Bağırsak Dokusu Üzerine Histopatolojik Etkisi ve Kuersetin ve Kateşin'in Koruyucu Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Ankara.

[64]. Sefi, M., Chaâbane, M., Elwej, A., Bejaoui, S., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Gouiaa, N., Sellami, T., Cafsi, M., Zeghal, N., Soudani, N. (2020). Zinc alleviates maneb-induced kidney injury in adult mice through modulation of oxidative stress, genotoxicity and histopathological changes. *Environmental Science and Pollution Research International,* **27(8),** 8091-8102. Erişim Tarihi 12.03.2021, https://search.proquest.com/openview/ebc77d0aed6fd0e8d86119465b9ac445/1?pq-origsite=gscholar&cbl=54208

[65]. Aşkın, M. (2019). Ratlarda Midpalatal Sutur Osteotomisi ile Uygulanan Üst Çene Genişletmesi Sonrası Kemik Oluşumuna Tannik Asitin Etkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ortodonti Anabilim Dalı. Erzurum.

[66]. Çalışlar, S. (2018). Tanenlerin Kanatlı Hayvan Beslemede Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi,* **21 (4),** 615-623. Erişim Tarihi 15.03.2021

[67]. Chu, X., Guo, Y., Xu, B., Li, W., Lin, Y., Sun, X., Ding, C., Zhang, X., (2015). Effects of Tannic Acid, Green Tea and Red Wine on hERG Channels Expressed in HEK293

Cells. PLOS ONE Journal, 10 (12). Erişim Tarihi 15.03.2021,https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143797.

[68]. Karakurt, S. (2008). The Effects Of Phenolıc Compound Tannıc Acıd On Phase Iı And Cytochrome P450 Dependent Enzymes In Rabbıt Lıver And Kıdney, The Degree Of Master, Mıddle East Technıcal Unıversıty, A Thesıs The Graduate School Of Natural And Applıed Scıences, Scıence In Bıochemıstry. Ankara.

[69]. Daana, J. (2018). Tannik Asit Modifiyeli Manyetik Nanotanecikler Üzerine γ-Glutamil Transpeptidazın Kovalent İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Ankara.

[70]. Ahmad, T. (2014). Reviewing the tannic acid mediated synthesis of metal nanoparticles. Journal of Nanotechnology, 11, 18-39.

[71]. Sahiner, N. and Sengel, S. B. (2016). Tannic acid decorated poly (methacrylic acid) micro and nanoparticles with controllable tannic acid release and antioxidant properties. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 508, 30-38

[72]. Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M. and Messersmith, P. B. (2007). Musselinspired surface chemistry for multifunctional coatings. Science, 318(5849), 426- 430.

[73]. Baldwin A., Booth, B. (2022). Biomedical applications of tannic acid. Journal of biomaterials applications, Vol.0 (0)1-21, Erişim Tarihi 08.08.2022, https://www.researchgate.net/publication/357659803_Biomedical_applications_of_tannic_acid/link/62052ea4cf7c2349ca075f99/download.

[74]. Velmurugan P, Singam ERA, Jonnalagadda RR, et al. Investigation on interaction of tannic acid with type I collagen and its effect on thermal, enzymatic, and conformational stability for tissue engineering applications. Biopolymers 2014; 101(5): 471–483.

[75]. Gauza-Włodarczyk M, Kubisz L and Włodarczyk D. Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. Int J Biol Macromol 2017; 104: 987–991.

[76]. Wilson WC, Macgregor AR and Stewart CP. The clinical course and pathology of burns and scalds under modern methods of treatment. Br J Surg 1938; 25: 826–865.

[77]. Perumal, P., Mhlanga, P., Somboro, M.A., Amoako, D.G., Khumalo, H.M., Khan, R.M. (2019). Cytoproliferative and Anti-Oxidant Effects Induced by Tannic Acid in Human Embryonic Kidney (Hek-293) Cells. Biomolecules. Dec; 9 (12): 767, Erişim Tarihi 08.08.2022, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995534/.

[78]. Croft K.D. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? Arch. Biochem. Biophys. 2016;595:120–124. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.014.

[79]. Wang T.Y., Li Q., Bi K.S. Bioactive flavonoids In Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fateasian. Journal of Pharmaceutical Sciences. Asian J. Pharm. Sci. 2018;13:12–23. doi: 10.1016/j.ajps.2017.08.004.

[80]. Zhang P.-Y. Polyphenols in Health and Disease. Cell Biochem. Biophys. 2015;73:649–664. doi: 10.1007/s12013-015-0558-z.

[81]. Somboro A.M., Osei Sekyere J., Amoako D.G., Kumalo H.M., Khan R., Bester L.A., Essack S.Y. In vitro potentiation of carbapenems with tannic acid against carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Exploring natural products as potential carbapenemase inhibitors. J. Appl. Microbiol. 2019;126:452–467. doi: 10.1111/jam.14141.

[82]. Badhani B., Sharma N., Kakkar R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. RSC Adv. 2015;5:27540–27557. doi: 10.1039/C5RA01911G.

[83]. Myint K.B., Sing L.C., Wei Z. Tannic Acid as Phytochemical Potentiator for Antibiotic Resistance Adaptation. APCBEE Procedia. 2013;7:175–181. doi: 10.1016/j.apcbee.2013.08.030.

[84]. Erdem, P. (2013). Synthesis, characterization and applications of polyphenol-Fe (III) complexes and tannic acid resin. The degree of doctor, Dokuz Eylül University, The graduate school of natural and applied sciences, Science in chemistry. İzmir.

[85]. Castaneda-Arriaga R, P´erez-Gonz´alez A, Reina M, et al. Comprehensive investigation of the antioxidant and prooxidant effects of phenolic compounds: a double-edged sword in the context of oxidative stress? J Phys Chem B 2018; 122(23): 6198–6214.

[86]. Zhou L and Elias RJ. Antioxidant and pro-oxidant activity of (-) epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: influence of pH and phenolic concentration. Food Chem 2013; 138(2–3): 1503–1509.

[87]. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. Biomed Res Int 2014; 2014: 761264.

[88]. Vattem DA and Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: a review. J Food Biochemistry 2005; 29(3): 234–266.

[89]. Cruz BH, D´ıaz-Cruz JM, Ariño C, et al. Heavy metal binding by tannic acid: a voltammetric study. Electroanalysis: An Int J Devoted Fundam Pract Aspects Electroanalysis 2000;12(14): 1130–1137.

[90]. Lerf A andWagner FE. Model compounds of iron gall inks–a M¨ossbauer study. Hyperfine Interact 2016; 237(1): 36.

[91]. Sieniawska E., Baj T. Tannins. In: Simone B., Rupika D., editors. Pharmacognosy. Elesvier; London, UK: 2017. pp. 219–232.

[92]. Gülçin İ., Huyut Z., Elmastaş M., Aboul-Enein H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arab. J. Chem. 2010;3:43–53. doi: 10.1016/j.arabjc.2009.12.008.

[93]. Greenwell M and Rahman PK. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. Int J Pharm Sci Res 2015; 6(10): 4103–4112.

[94]. Khan HY, Hadi SM, Mohammad RM, et al. Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. In InFunctional foods in cancer prevention and therapy. London: Academic Press, 2020, pp. 221–236.

[95]. Ullah MF, Khan HY, Zubair H, et al. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2011; 67(1): 103–110.

[96]. Farhan M, Oves M, Chibber S, et al. Mobilization of nuclear copper by green tea polyphenol epicatechin-3-gallate and subsequent prooxidant breakage of cellular DNA: implications for cancer chemotherapy. Int J Mol Sci 2017; 18(1): 34.

[97]. Kaspchak E, Mafra LI and Mafra MR. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. Food Chem 2018; 252: 1–8.

[98]. Kayukawa CTM, de Oliveira MAS, Kaspchak E, et al. Effect of tannic acid on the structure and activity of Kluyveromyces lactis β-galactosidase. Food Chem 2019; 275: 346–353.

[99]. Girard M, Thanner S, Pradervand N, et al. Hydrolysable chestnut tannins for reduction of postweaning diarrhea: efficacy on an experimental ETEC F4 model. PLoS One 2018;13(5): e0197878.

[100]. Bonelli F, Turini L, Sarri G, et al. Oral administration of chestnut tannins to reduce the duration of neonatal calf diarrhea. BMC Vet Res 2018; 14(1): 227–236.

[101]. Majidinia M, Bishayee A and Yousefi B. Polyphenols: Major regulators of key components of DNA damage response in cancer. DNA Repair 2019; 82: 102679.

[102]. Sahiner, N., Sagbas, S., Aktas, N. and Silan, C. (2016). Inherently antioxidant and antimicrobial tannic acid release from poly (tannic acid) nanoparticles with controllable degradability. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 142, 334-343.

[103]. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, et al. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. FEBS Letters 2006; 580(2): 533–538.

[104]. Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. National Library of Medicine. Erişim Tarihi 20.05.2022, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858338/.

[105]. Allahverdiyev, A. 2018, Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 183-184.

[106]. xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Genomax Technologies. Erişim Tarihi 12.09.2021,https://www.genomaxtech.com/index.php/popular-articles/147-xcellingence.

[107]. Ke, N., Wang, X., Xu, X., Abbasi, Y. (2011). The xCELLigence system for real- time and label-free monitoring of cell viability. Erişim Tarihi 12.09.2021, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21468966/.

[108]. Lermi, A. (2018). Enfeksiyon Hastalıkları.Thoma lamı ile hücre sayımı. Erişim Tarihi 22.04.2022, https://enfeksiyonhastaliklari.com/thoma-lami-ile-hucre-sayimi/.

[109]. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Föyü. (2019-2020 Güz Dönemi). Bursa Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Erişim Tarihi 22.04.2022, https://depo.btu.edu.tr/dosyalar/gida/Dosyalar/2019-2020%20g%C3%BCz%20d.%20g%C4%B1da%20mikrob.%20f%C3%B6y%C3%BC.pdf.

[110]. Sun L., Zhang S., Guo W., He W., Qıan Y., Qu, G., Jı H., Rong H. (2014). Sublethal exposure of organophosphate pesticide chlorpyrifos alters cellular iron metabolism in hepatocytes and macrophages. *International Journal Of Molecular Medicine*, **34**:1395–1400. Erişim Tarihi 04.07.2022, https://www.spandidos-publications.com/ijmm/34/5/1395.

[111]. Polláková, J., Pistl, j., Kovalkovičová, N., Csank, T., Kočišová, A., Legáth, J. (2012). Use of Cultured Cells of Mammal and Insect Origin to Assess Cytotoxic Effects of the Pesticide Chlorpyrifos, Pol. J. Environ. Stud. Vol. 21, No. 4 (2012), 1001-1006. Erişim Tarihi 05.08.2022

[112]. Van Emon J.M., Pan P., Breukelen F. (2018). Effects of Chlorpyrifos and Trichloropyridinol on HEK 293 Human Embryonic Kidney Cells. *Chemosphere.* **191:**537–547. Erişim Tarihi 04.07.2022, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7462251/pdf/nihms-1040809.pdf.

[113]. Darıverenli, E. (2016). Levetirasetam Ve Nefirasetamın Nb2a Hücre Kültür Hattındaki Etkileri. Uzmanlık Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Manisa.

[114]. Sandoval L, Rosca A, Oniga A, Zambrano A, Ramos JJ, González MC, Liste I, Motas M. Effects of chlorpyrifos on cell death and cellular phenotypic specification of human neural stem cells. Sci Total Environ. 2019 Sep **15;683**:445-454. doi: 10.1016/j.scitotenv. 2019.05.270. Epub 2019 May 20. PMID: 31136966.

[115]. Oostingh, G.J., Wichmann, G., Schmittner, M., Lehmann, I., & Duschl, A. (2009). The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects, Journal of Immunotoxicology, **6:**2, 136-145, Erişim Tarihi 04.08.2022, https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476910902977407.

[116]. Tirelli, V., Catone, T., Turco, L., Di Consiglio E., Testai, E., and De Angelis, I. 2006. Effects of the pesticide chlorpyrifos on an in vitro model of interstinal barrier. Toxicol In Vitro **21:** 308–313.

[117]. Liang. Y., Long, D., Xu, M., Wang, H., Sun, Y., Wu, Y. (2021). Body fluids from the rat exposed to chlorpyrifos induce cytotoxicity against the corresponding tissue-derived cells in vitro. BMC Pharmacology and Toxicology, **22:**60, Erişim Tarihi 04.08.2022, https://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40360-021-00531-9.pdf.

[118]. Bouki E, Dimitriadis VK, Kaloyianni M, et al. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. Mar Environ Res 2013; **85:** 13–20.

[119]. Mitra I, Saha A and Roy K. Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. Mol Simulation 2010; **36(13):** 1067–1079.

[120]. Kaczmarek B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. Materials 2020; **13(14):** 3224.

[121]. Saraiva M, Castro RH, Cordeiro RP, et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of Schinopsis brasiliensis Engl.(Anacardiaceae). Afr J Pharm Pharmacol 2011; **5(14):** 1724–1731.

[122]. Gali-Muhtasib, H. U., Yamout, S. Z. and Sidani, M. M. (2000). Tannins protect against skin tumor promotion induced by ultraviolet-B radiation in hairless mice. Nutrition and Cancer, **37(1):**73-77.

[123]. Soyocak, A., Coşan, D., Başaran, A., Güneş, H.V., Değirmenci, İ. Evaluation of Bax protein in breast cancer cells treated with tannic acid. *Dicle Tıp Dergisi,***38 (1),** 1-6. Erişim Tarihi 25.06.2022, https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/54216.

[124]. Jordan LG and Booth BW. HER2+ breast cancer cells undergo apoptosis upon exposure to tannic acid released from remodeled cross-linked collagen type I. J Biomed Mater Res Part A 2018; **106(1):** 26–32.

[125]. Booth BW, Inskeep BD, Shah H, et al. Tannic acid preferentially targets estrogen receptor-positive breast cancer. Int J Breast Cancer 2013; 2013: 369609.

[126]. Nie F, Liang Y, Jiang B, et al. Apoptotic effect of tannic acid on fatty acid synthase over-expressed human breast cancer cells. Tumor Biol 2016; **37(2):** 2137–2143.

[127]. Karakurt S and Adali O. Tannic acid inhibits proliferation, migration, invasion of prostate cancer and modulates drug metabolizing and antioxidant enzymes. Anti-Cancer Agents Med Chem 2016; **16(6):** 781–789.

[128]. Baer-Dubowska W, Szaefer H, Majchrzak-Celi´nska A, et al. Tannic acid: specific form of tannins in cancer chemoprevention and therapy-old and new applications. Curr Pharmacol Rep 2020; **6(2):** 28–37.

[129]. Darvin P, Baeg SJ, Joung YH, et al. Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. Int J Oncol 2015; **47(3):** 1111–1120.

[130]. Darvin P, Joung YH, Kang DY, et al. Tannic acid inhibits EGFR/STAT 1/3 and enhances p38/STAT 1 signalling axis in breast cancer cells. J Cell Mol Med 2017; **21(4):** 720–734.

[131]. Nagesh PKB, Chowdhury P, Hatami E, et al. Tannic acid inhibits lipid metabolism and induce ROS in prostate cancer cells. Scientific Reports 2020; **10(1):** 1–5.

[132]. Nagesh P, Hatami E, Chowdhury P, et al. Tannic acid induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in prostate cancer. Cancers 2018; **10(3):** 68.

[133]. Stefanidou M, Maravelias C, Dona A, Spiliopoulou C. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch Toxicol* 2006; **80:** 1-9.

[134]. Maggini S, Wenzlaff S, Hornig D. Essential role of vitamin C and zinc in child immunity and health. J Int Med Res 2010; **38:** 386-414.

[135]. Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Bio Metals 2001; **14:** 315- 330.

[136]. Sunderman FW. The influence of zinc on apoptosis. Ann Clin Lab Sci 1995; **25:** 134-142.

[137]. Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. Increased apoptosis in variety of tissues of zinc-deficient rats. Life Sci 2001; **69:** 1639-1649.

[138]. Yang V. Li. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. Endocrine.2014; **45:**178–189.

[139]. Yunan Tanga, Qin Yang, Jiayin Lu, Xiaolin Zhang, Di Suen, Yi Tan, Litai Jin, Jian Xiao, Rujia Xie, Madhavi Rane, Xiaokun Li, Lu Cai. Zinc Supplementation Partially Prevents Renal Pathological Changes In Diabetic Rats. Journal of Nutritional Biochemistry 2010; **21:** 37–246.

[140]. Faa G, Nurchi VM, Ravarino A, Fanni D, Nemolato S, Gerosa C, Eyken PV, Geboes K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. Coord Chem Rev 2008; **252:** 1257-1269.

[141]. Maret W, Sandstead HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. J Trace Elem Med Biol. 2006; **20(1):** 3-18.

[142]. Belgemen T, Akar N. Çinkonu yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler. Ankara Üniv Tıp Mecm 2004; **57(3):** 161-166.

[143]. Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. Werkstofftech 2002; **33**: 764-769.

[144]. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. Trends Immunol 2006; **28(1):** 1-4.

[145]. Alscher DM, Braun N, Biegger D, Stuelten C, Gawronski K, Murdter TE, Kuhlmann U, Fritz P. Induction of metallothionein in proximal tubular cells by zinc and its potential as an endogenous antioxidant. Kidney Blood Press Res 2005; **28(3):** 127-33.

[146]. Sharma R, Sharma M, Datta PK, Savin VJ. Induction of metallothionein- I protects glomeruli from superoxide-mediated increase in albümin permeability. Exp Biol Med 2002; **227:** 26-31.

[147]. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Castantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kromer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. J Exp Med 2000; **192(4):** 571-580.

[148]. Zou Y, Niu P, Yang J, Yuan J, Wu T, Chen X. The JNK signaling pathway is involved in sodium-selenite-induced apoptosis mediated by reactive oxygen in HepG2 cells. Cancer Biol and Ther 2008; **7(5):** 691- 698.

[149]. Vega-Robledo, G.B., Polo-Jiménez, A., Morales-Martínez, M. E., Rojas-Dotor, S., Rico-Rosillo, G. (2007). Effect of Zinc Upon Human and Murine Cell Viability and Differentiation. Biol Trace Elem Res **120:**133–140. Erişim Tarihi 15.08.2022, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916965/.

[150]. Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, Kaplan J, Brewer GJ, Bach JF, Dardenne M (1988) Serum thymulin in human zinc deficiency. J Clin Invest **82:**1202–1210.

[151]. Chandra RK (1984) Excessive intake of zinc impairs immune responses. JAMA **252:**1443–1446.

[152]. King LE, Fraker PJ (2000) Variations in the cell cycle status of lymphopoietic and myelopoietic cells created by zinc deficiency. J Infect Dis **182:**16–22.

[153]. Strrie H, Stupp SI (2005) Cellular response to zinc-containing organo apatite. An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. Biomaterials **26:**5492–5499.

[154]. Kanekiyo M, Itoh N, Kawasaki A, Matsuda K, Nakanishi T, Tanaka K (2002) Metallothionein is required for zinc-induced expression of the macrophage colony stimulating factor gene. J Cell Biochem **86:**145–153.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ VE SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS, TANNİK ASİT VE ÇİNKONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%14	%13	%3	%5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
5	abis-files.yildiz.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	earsiv.kastamonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
10	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
11	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	www.pjps.pk İnternet Kaynağı	<%1
13	L. Gómez-Limia, N. Cobas, I. Franco, S. Martínez-Suárez. "Fatty acid profiles and lipid quality indices in canned European eels: Effects of processing steps, filling medium and storage", Food Research International, 2020 Yayın	<%1
14	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1