

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SPINOSAD'IN SIÇAN KARACİĞERİ ÜZERİNE HİSTOLOJİK ETKİSİ

Burak TUNÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SPINOSAD'IN SIÇAN KARACİĞERİ ÜZERİNE HİSTOKİMYASAL ETKİSİ

Burak TUNÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nursel GÜL

Biyo-insektisit olan spinosad, zararlı böceklerle mücadelede giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu insektisit hem hedef olan canlıları (böcekler) hem de hedef olmayan canlıları (dolaylı yoldan insan ve diğer omurgalılar) etkilemektedir. Spinosad böcekleri etkisiz hale getirirken, insanlar da kazara bulaşma olursa bu maddeden etkilenmektedir. Bu nedenle insanın da dahil olduğu memeli grubundaki sıçanlar deneylerde örnek model olarak kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan sıçanlar 14 gruba ayrıldı. İki kontrol grubu, altısı Spinosad uygulanan grup, altısı Spinosad + E vitamini uygulanan grup olarak belirlendi. Her grupta 3 birey kullanıldı. Spinosad uygulandıktan 24 saat, 72 saat ve 1 hafta sonra sıçanlar eter anestezisi ile bayıltılıp, sakrifiye edildi ve bu sıçanlardan karaciğer dokuları disekte edildi. Doku örnekleri Hemotoksilen – Eosin boyaması ile ışık mikroskobunda ve DAPI boyaması ile floresans mikroskobunda incelendi.

Yapılan incelemeler sonunda spinosadın 9mg/kg ve 37.38 mg/kg dozları uygulandıktan 72 sonra sıçan karaciğerinde bağışıklık hücrelerinin bulunmasına, hepatositlerde yapısal hasarların meydana gelmesine ve Disse aralığı ile sentral venlerde çok sayıda eritrosit hücrelerinin bulunmasına neden olduğu ışık mikroskobunda gözlemlendi. Kullanılan dozların uygulanmasından bir hafta sonra 72 saat uygulamasına göre daha az hasar tespit edildi. Tedavi amacıyla uygulanan 200 mg/kg E vitamini dozunun karaciğer yapısında kontrol grubuna yakın yapısal özellikler gözlemlendi.

Yapılan bu tez çalışması spinosadın karaciğer yapısına hücresel yönden hasar verdiği buna karşılık E vitamini uygulamasının karaciğer yapısını olumlu yönde etkilediğini gösterdi. Elde edilen bulgular, literatürde bu konuda eksik olan mikroskobik gözlemlerin tamamlandığı ve bulgular gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara uygun kaynak olacağı düşünüldü.

Eylül 2020, 37 sayfa

Anahtar Kelimeler: Spinosad, İnsektisit, *Rattus Norvegicus*, Karaciğer,

ABSTRACT

Master Thesis

HISTOLOGICAL EFFECTS OF SPINOSAD ON RAT LIVER

Burak TUNÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nursel GÜL

Spinosad, the bio-insecticide, is increasingly used to combat pests. This insecticide affects both target creatures (insects) and non-target creatures (indirectly human and other vertebrates). While spinosad neutralizes insects, humans are also affected by this substance if it is accidentally contaminated. Therefore, rats in the mammal group, including humans, were used as model models in experiments. The rats used in the experiments were divided into 14 groups. Two were the control group, six were the Spinosad applied group, and six were the Spinosad + vitamin applied group. Three individuals were used in each group. 24 hours, 72 hours, and 1 week after spinosad was applied, rats were anesthetized and sacrificed under ether anesthesia, and liver tissues were dissected from these rats. Tissue samples were examined under light microscope with Hematoxylin-Eosin staining and under fluorescence microscope with DAPI staining.

At the end of the examinations, it was observed in the light microscope that after 72 doses of spinosad were administered at doses of 9mg / kg and 37.38mg / kg, it caused the presence of immune cells in the rat liver, structural damage in hepatocytes and the presence of numerous erythrocyte cells in the Disse gap and central veins. One week after the administration of the used doses, less damage was detected compared to the 72-hour application. The liver structure of the 200 mg / kg vitamin E dose administered for therapeutic purposes was observed to have structural features close to the control group.

This thesis study showed that spinosad damaged the liver structure cellularly, whereas the application of vitamin E positively affected the liver structure. It was thought that the findings obtained, microscopic observations lacking in the literature on this subject were completed and the findings would be a suitable source for future studies on this subject.

September 2020, 37 Pages

Key Words: Spinosad, Insecticide, *Rattus Norvegicus*, Liver

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle katkı sağlayan, her konuda yardımını esirgemeyen, kendisini çok sevdiğim danışman hocam Prof. Dr. Nursel GÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), bu tezi yazmam da ve motivasyon konusunda hep yanımda olan, beni her zaman destekleyen Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarında çalışırken birçok konuda yardımcı olan Ezgi ÖZEN'e çok teşekkür ederim. Yıllardır manevi anlamda beni ayakta durmamı sağlayan her zaman yanımda olan ve çok sevdiğim Nurehan Rahmah YEŞİLYURT'a, bu zamana kadar her zaman beni destekleyen, maddi ve manevi yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Burak TUNÇ
Ankara, Eylül 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Pestisitler	3
2.2 Spinosad	4
2.3 Karaciğer	5
2.4 <i>Rattus Norvegicus</i>	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	8
3.1 Deney Hayvanlarının Bakımı.....	8
3.2 Işık Mikroskobu Preparasyonu	9
3.3 Hayvanlara Spinosad Uygulanması	8
3.4 Hematoksilen-Eosin Boyama Tekniği	9
3.5 DAPI Boyama Tekniği.....	10
4. BULGULAR	11
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ.....	37

KISALTMALAR DİZİNİ

AchE	Asetilkolinesteraz
bw	Vücut ağırlığı
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür
H&E	Hematoksilen ve Eozin
LC 50	Letal konsantrasyon
LD 50	Letal doz (öldürücü doz)
NOAEL	Gözlemlenen olumsuz etki düzeyi
PKS	Poliketid sentaz
SPD	Spinosad
spn	Spinosin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Spinosad'ın piyasada satılan toz (turkish.alibaba.com) ve sıvı çözelti (turkish.alibaba.com) ambalajları	1
Şekil 1.2 Spinosyn A ve D 'nin açık yapısı (Kirst 2010).....	2
Şekil 4.1 Hematoksilen ve Eozin ile boyanan kontrol grubu sıçan karaciğeri. Eritrositler (E), disse aralığı (ok), sentral ven (SV), Kupffer hücresi (K), hepatositteki çift çekirdek (ok başı) x40	11
Şekil 4.2 Kontrol grubu sıçan karaciğerinin genel yapısı. Kupffer hücreleri (ok), H&E x40	12
Şekil 4.3 DAPI boyası ile boyanan kontrol grubu sıçanların (E vitamini ve zeytinyağı verilen) karaciğerindeki hepatosit çekirdeklerinin morfolojileri ve boyutlarının görüntüsü. Hücre çekirdeği (ok) x40	12
Şekil 4.4 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad uygulandıktan sonraki hematoksilen ve eozin ile boyanan sıçan karaciğerinin sentral ven ve çevresinin görüntüsü. Sentral ven (SV), Kupffer hücresi (ok), disse aralığı (yıldız), Eritrositler (E) x40	13
Şekil 4.5 DAPI ile boyanan 24 saat süreli 9 mg'lık Spinosad uygulanan sıçanlardaki hepatositlerin çekirdek morfolojisi (ok). Sentral ven (SV) x40.....	14
Şekil 4.6 Spinosad (9 mg) uygulamasından 72 saat sonra, sıçan karaciğerlerindeki hepatositlerde çekirdek küçülmesi (çift ok) ve sitoplazmik kayıp (ok başı), sentral vende eritrosit yığınları (E) ile Kupffer hücreleri (ok). H&E x40	14
Şekil 4.7 Spinosad (9 mg) uygulanmış 72 saatlik sıçan karaciğerinin DAPI boyamasıyla elde edilen Floresans mikroskobu görünümü. Hepatositlerde çekirdek küçülmesi (çift ok), sentral ven aralığındaki kümeleşmiş eritrositler (E), Kupffer hücresi (ok) x40.....	15
Şekil 4.8 Sıçanlara 9 mg Spinosad uygulandıktan 1 hafta sonra alınan karaciğer yapısı. Hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (çift ok), sentral ven aralığındaki Kupffer hücresi (ok), eritrositler (E). H&E x40.....	15
Şekil 4.9 Sıçanlara 1 hafta 9 mg Spinosad uygulandıktan sonra ve DAPI boyanan karaciğer dokusunun florasan mikroskoptaki sentral ven aralığındaki eritrositler (E), hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (ok), disse aralığındaki Kupffer hücresi (çift ok), hücre çekirdeğinde büyüme (yıldız) x40	16
Şekil 4.10 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulandıktan sonra Hematoksilen-Eozin boyaması ardından karaciğer dokusunda görülen disse aralıklarındaki eritrositler (ok), hücre çekirdeğinin küçülmesi (çift ok) ve hücrelerin birbirinden ayrılması (yıldız), hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yığılması (ok başı) x40.....	17

Şekil 4.11 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulanan karaciğer örneğinin floresans mikroskobu görüntüsü. DAPI boyamasında görülen hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığını (ok başı), bazı hepatositlerde küçülmüş çekirdek morfolojisi (çift ok) x40	17
Şekil 4.12 72 saatlik 9 mg Spinosad + E vitamini uygulaması ardından sıçanlardan alınan karaciğer hepatositlerindeki çekirdeğin küçülmesi (ok), hepatositlerin birbirinden uzaklaşması ({}), hepatositteki çift çekirdek (yıldız), sentral vende eritrosit yığını (E), disse aralıklarındaki Kupffer hücreleri (çift ok). H&E x40	18
Şekil 4.13 72 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulaması ardından sıçanların karaciğer dokusunun DAPI boyama ile boyanan hepatositlerin çekirdeklerinde küçülme (çift ok), hepatosit çekirdekçiklerinin büyümesi (ok), hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığını (yıldız), sentral vende eritrositler (E) x40	19
Şekil 4.14 Bir haftalık 9 mg Spinosad + E vitamini uygulmuş karaciğer örneği. Hepatositlerde çekirdek küçülmesi (ok), Disse aralığında Kupffer hücreleri (çift ok), hücrelerin birbirinden uzaklaşması (yıldız), sentral vende eritrosit yığını (E) H&E x40	20
Şekil 4.15 Hepatositlerin çekirdeğinde kromatin yığını (ok başı), Disse aralıklarında Kupffer hücreleri (ok) x40	20
Şekil 4.16 Işık mikroskobunda hepatositlerin çekirdeklerinin küçülmesi (ok), hepatositlerin birbirinden uzaklaşması (ok başı), hepatositlerde çift çekirdek (yıldız), sentral vende eritrosit yığını (E), Disse aralıklarında Kupffer hücreleri (çift ok) H&E x40	21
Şekil 4.17 Floresans mikroskobunda hepatositlerde kromatin yığını (ok), Disse aralıklarında eritrositler (E). DAPI boyası x40	22
Şekil 4.18 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad dozlu karaciğer dokusunun ışık mikroskobunda (Hematoksilen – Eosin) boyanan hepatositlerin birbirinden uzaklaşması (ok başı), hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (çift ok), hepatosit sitoplazmasında erime (yıldız), sentral vende eritrositler (E), disse aralıklarında Kupffer hücresi (ok) x40	23
Şekil 4.19 Floresans mikroskobunda 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad dozu verilen DAPI ile boyanan hepatositlerin çekirdeklerinin küçülmesi (ok), Disse aralıklarındaki eritrositler (E) x40	23
Şekil 4.20 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad dozu uygulanan hepatositlerin sitoplazmasındaki kayıp (ok başı), hepatosit çekirdeğinin morfolojisindeki bozulma (ok), hepatosit çekirdeğindeki kromatin yığını (çift ok), disse aralığındaki Kupffer hücresi (K) H&E x40	24

Şekil 4.21 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad dozu uygulanan karaciğer örneklerinde floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerin aynı boyutlardaki çekirdekler (ok), disse aralıklarında ve sentral vende eritrositler (E) x40	25
Şekil 4.22 Işık mikroskopunda 37,38 mg + E vitamini / 24 saat Spinosad dozu uygulanan karaciğer histolojisi. Hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığını (ok başı)Disse aralığındaki Kupffer hücresi (K) H&E x40.....	26
Şekil 4.23 37,38 mg / 24 saat Spinosad dozu uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositteki çekirdek küçülmesi (ok), Çekirdeklerde kromatin yığını (ok başı) Disse aralığındaki Kupffer hücresi (K) x40	26
Şekil 4.24 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan karaciğer örneğinde Hematoksilen – Eosin ile boyanan hepatosit sitoplazmasında erime (yıldız), disse aralığındaki ve sentral vendeki Kupffer hücresi (ok), sentral vendeki eritrositler (E) x40	27
Şekil 4.25 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerin çekirdeğindeki morfolojik bozulma (yıldız), hepatosit çekirdeğinde aşırı büyüme (ok), sentral vende eritrositler (E) ve Kupffer hücresi (K) x40.....	28
Şekil 4.26 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan ışık mikroskopunda hepatositlerdeki sitoplazma kaybı (ok), disse aralığındaki eritrositler (E) x40	29
Şekil 4.27 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerdeki kromatin yığını (ok başı), sentral ven eritrositler (E) x40	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Spinosad uygulamasından sonra deney hayvanlarının (14 sıçan grubu)karaciğerindeki hücresel hasarların karşılaştırılması.....	30
--	----



1. GİRİŞ

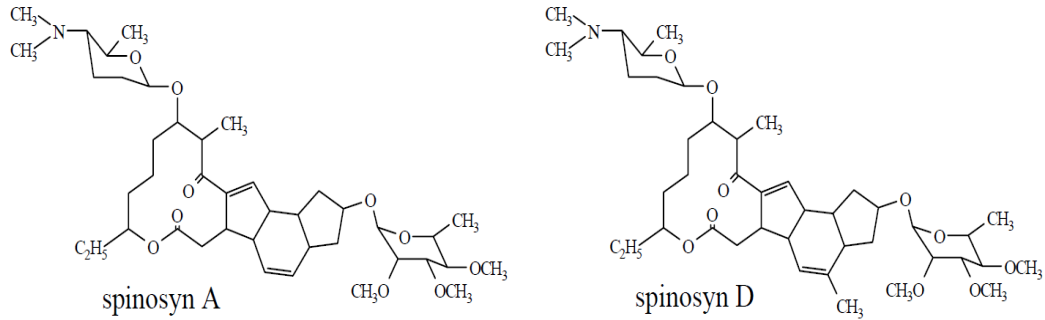
Spinosad, etken maddesi $C_{41}H_{65}NO_{10}$ kimyasal formüle ve 731,30 gr / mol molekül ağırlığı olan, karakteristik bir kokusu olan, beyaz renkte, toz formunda katı bir hammaddedir. Spinosad, tarım ilaçlarında, insektisitlere karşı üretilen bazı tarım ilaçlarının ana etken maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Bu etken madde ile geliştirilen formüllerle, patatesten patates böceği, antep fıstığında yaprak psillası, domateste pamuk yaprak kurdu, patlıcan ve biberlerde çiçek tripsi ve salatalıklarda yaprak galeri sinekleri ile mücadelede kullanım alanı bulur (PubChem).



Şekil 1.1 Spinosad'ın piyasada satılan toz (turkish.alibaba.com) ve sıvı çözelti (turkish.alibaba.com) ambalajları

Bu kimyasal diğer insektisitlerden farklı olarak böceklerin sinir sistemi üzerinde etki göstermektedir. Özellikle, spinosad düşük dozlarda memelilere toksik etkilidir (Tao, 2019). Spinosad doğal bir ürün olarak kabul edilir ve birkaç ülke tarafından organik tarımda kullanım için onaylanmıştır. Ayrıca pire istilasının tedavisi ve önlenmesi (*Ctenocephalides felis*) yeniden enfestasyonlara karşı koruyucu etki, yetişkin öldürücü aktivite ve yumurta üretimindeki azalmanın bir sonucudur ve ürünün tek bir uygulamasından sonra 4 haftaya kadar devam eder (European Medicines Agency). Buna ilave olarak, dört yıldan fazla bit istilasına maruz kalmış hastalara % 0.9'luk topikal solusyonu (Natroba) halinde uygulandığı rapor edilmiştir (Tao 2019).

Spinosad, 1982 yılında aslen Karayip adasından izole edilmiş olan aktinomisit *Saccharopolyspora spinosa*'nın fermentasyonundan elde edilmiştir (Tao 2019). Spinosanların insektisit olarak kullanılan formüllerinde etken madde spinosin (spn) çeşitleridir. Spinosanlar, D-forosamin ve tri-O-metil-L-rhamnose ile süslenmiş bir tetrasiklik çekirdeği ihtiva eden polietid-türetilmiş makrosiklik laktonlardır. Spinosin bileşenleri, polipidid veya deoksişekerler üzerindeki farklı metilasyon dereceleri ile birbirlerinden farklılık gösterir. Spinosin bileşiklerinden en aktif olanları, spinosin A ve D'dir. Bira mayasında bulunan Spinosin biyosentetik gen kümesi, DNA dizilimi ve gen bozulmaları; *S. spinosa* (maya)'nın 74 kb bölgesinde bulunan on dokuz genden oluşur (Tao 2019). Spinosin genomu ve bir tip I poliketid sentaz (PKS) kodlayan beş büyük gen (spnA, B, C, D ve E) içerir. Bu gen kümesindeki diğer on dört gen, intramoleküler karbon-karbon bağ oluşumunda rol oynayan dört gen (spnF, J, L ve M), iki karbonhidrat oluşumu, iki glikotransferaz geni (spnG ve P), beş forosamin biyosentetik gen (spnG ve P) içeren makrolakton modifikasyonunda rol oynar. spnO, N, Q, R ve S ve rhamnoz modifikasyonu için üç O-metiltransferaz geni (spnI, K ve H). Bununla birlikte, dört adet rhamnoz biyosentezi geni spinosin gen kümesinin dışına yerleştirilmiştir. Spinosad büyük bir potansiyel pazar ile güçlü bir böcek ilacıdır (Tao 2019) .



Şekil 1.2 Spinosyn A ve D 'nin açık yapısı (Kirst 2010)

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Pestisitler

Pestisitler, zarar verici hayvanlar ve bitkiler üzerinde organizmaların zararlarını indirmek veya kontrol altına almak, hücre içine girişini engellemek için kullanılan bileşiklerdir (Özkaya vd. 2013). Pestisitler grubunda olan ve böceklere karşı mücadelede kullanılan insektisitler, tarımsal üretimi artırmak amacıyla kullanılan insektisitler olarak bilindikleri için birçok yerde “tarım ilacı” olarak da isimlendirilir. Başka bir yönden de, evde ve diğer pek çok alanda kullanımları yaygındır. Yaygın kullanım alanları ile paralel olarak, uygulama anında tulum ve maske kullanmamak gibi önlem almamak, paketlenme ve saklama yanlışlıkları ve bilinçsiz tüketim gibi olaylar ve intihar için alımdan dolayı çevremizde insektisit zehirlenmeleri ile karşılaşmaktadır (Özkaya vd. 2013).

Organofosfatlı insektisitler ve karbamatlar bu grupta yer almaktadır. Organofosfatlı insektisitler, ilk olarak 1937 yılında Alman kimyacı Schrader ve ekibi tarafından sentezlenmiştir. Karbamat bileşikler de ilk kez 1930’larda sentezlenmiştir ve fungusit olarak kullanılmaya başlanmıştır. İnsektisit aktivitesi göstermeleri ve memelilerde düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle ilerleyen zamanlarda yeni karbamat bileşikler geliştirilmeye başlanmıştır. Bugünlerde çevremizde kullanılan 200 farklı organofosfatlı insektisit ve yaklaşık 25 adet karbamat bileşiği içeren insektisit bulunmaktadır (Özkaya vd. 2013). Organofosfatlı insektisitler, fosforik asit veya fosforotiyoik asit esterleri; karbamatlı insektisitler ise karbamik asit bileşikleridir. Hem organofosfatlı insektisitler hem de karbamatlı insektisitler, insektisit toksisite kaynağı asetilkolinesteraz enzim inhibisyonudur. Yan zincirlerindeki yapısal farklılıklardan dolayı toksikokinetik ve toksikodinamik özellikleri bakımından birbirlerinden ayrılırlar. (Özkaya vd. 2013).

2.2 Spinosad

Spinosad (SPD), doğal olarak oluşan toprak aktinomiseti *Saccharopolyspora spinosa*'nın (Bacteria: Actinobacteridae) aerobik fermantasyonunun ikincil bir metabolitidir (Kirst 2010). SPD, son üründe yaklaşık % 85:15 oranında bulunan iki insektisidal faktör, spinosin A ve D içerir (Kirst 2010). Fermantasyon karışımındaki ana bileşen olan spinosin A, iki farklı şekerin eklendiği bir tetrasiklik poliketidaglikondan oluşur; C-9 hidroksil grubu üzerinde bir nötrsakkarit ikame edicisi (2, 3, 4-tri-O-metila-L-ramnosil) ve C-17 hidroksil grubu üzerinde bir aminoşeker parçası (b-D-forosaminil) bulundurur. En bol ikinci fermentasyon bileşeni, 6-metil-spinosin A olan Spinosin D'dir (Kirst 2010). SPD, belirli eklembacaklılara, özellikle de kelebekler, kın kanatlılar ve sineklere karşı güçlü bir nörotoksindir (Bret vd. 1997). SPD'nin istemsiz kas kasılmalarına, titreme ile prostrasyona ve son olarak felce neden olan böcek sinir sisteminin aşırı uyarılmasını provoke eden nikotinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla yeni bir etki modu sergilediği gösterilmiştir. SPD ayrıca, böceklerin sinir sisteminin γ -amino bütirik asit (GABA) ile ilişkili iyon kanallarını da etkiler (Salgado 1998). SPD, yeni bir etkinlik tarzına sahip bir insektisit olarak tanımlanmış olmasına rağmen, bu biyo-insektisit uzun süreli etkinliğini sürdürmek için direnç yönetiminin gerekli olduğu kabul edilmektedir (Ramasubramanian ve Regupathy 2004, Bond vd. 2004). Üstelik SPD'nin, birçok yararlı böcek üzerinde çok az etki gösterdiği veya hiç etkisi olmadığı için seçici bir pestisit olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, memeliler için çok az toksisite sergiler ve çevrede bozunduğundan, elverişli bir çevresel profile sahiptir (Schoonover ve Larson 1995, Cleveland vd. 2001). Ayrıca SPD doğal bir üründür ve şu anda Mısır'da sentetik böcek ilaçlarına göre daha güvenli bir alternatif insektisittir. Dünya çapında birçok sertifikasyon kuruluşu tarafından organik tarımda kullanım için onaylanmıştır (Racke 2007).

SPD'nin hedef olmayan organizmalar üzerindeki etki potansiyeli tam olarak anlaşılamamıştır. Bu bağlamda, biriken bir kanıt, SPD'nin kullanımıyla ilişkili bazı potansiyel güvenlik kaygıları ve toksisite risklerini vurgulamıştır (Yano vd. 2002). SPD için akut oral sıçan LD50 değerleri 3738 ila 45000 mg / kg vücut ağırlığı arasındadır (Yano vd. 2002). Deney hayvanlarında 2.7 ila 8.6 mg / kg vücut ağırlığı (bw)

gözlemlenen olumsuz etki düzeyi (NOAEL) güvenlik sınırlarında olduğu bildirilmiştir (Yano vd. 2002). Alternatif olarak, tavşanlara topikal uygulama için NOAEL, 1000 mg / kg bw seviyesindedir. Son zamanlardaki raporlar SPD'nin bal arılarına 7,44 mg / l'lik bir LC50 ile toksik olduğunu göstermiştir (Rabea vd. 2010). Ayrıca, SPD'nin sergilediği gerçeğine rağmen, karasal kuşlara veya suda yaşayan omurgasızlara karşı herhangi bir akut toksisite olmamasına rağmen, adrenal bez, karaciğer, lenfoid hücreler, böbrek, tiroid, mide ve akciğer de dahil olmak üzere birçok dokuda SPD aracılı hücresel vakuolizasyon gözlemlenmiştir. Bu, lityumlarda polar lipit birikiminden kaynaklanan, ultra yapısal lizozomal lamellar inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna yol açan hücresel fosfolipidozdan kaynaklanır (Stebbins vd. 2002, Yano vd. 2002).

2.3 Karaciğer

Karaciğer vücudun en büyük bezi ve en büyük organıdır. Yaklaşık olarak 1,5 kilogram ağırlığındadır. Diyaframın alt kısmında yer alan abdominal boşlukta bulunur. Sindirim kanalından emilen besinleri işleyerek, daha sonra kullanılmak üzere depolar. Böylece kan ile sindirim sistemi arasında bir geçiş sağlar. Karaciğere kan portal venden (%70-80%, ince bağırsaklardan emilenler) ve hepatik arterlerle (kompleks lipitler = şilomikronlar lenf damarıyla) sağlanır. Dolaşım sisteminde ise metabolitlerin biriktirilmesi, dönüştürülmesi ve toksit maddelerin etkisizleştirilip elenmesinde (eleme kısmı safrada) görev alır. Ayrıca plazma proteinlerinin (albumin, diğer taşıyıcı proteinler) üretilmesinde önemli rol oynar. Karaciğer, ince bir bağ doku kapsülü olan Glisson kapsülü ile örtülüdür. Bu ince bağ doku yapısı hilumda kalınlaşır. Hilumda, karaciğere portal ven ve hepatik arter girerken, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar. Karaciğerin temel elamanı hepatosit yani karaciğer hücresidir. Bu hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar şeklinde konumlanırlar. İnsanlarda, karaciğer lobülleri birbirleriyle temas halindeyken, hayvanlarda (örneğin domuzlarda), bağ dokusu tabakasıyla birbirlerinden ayrılırlar (Aytekin ve Solakoğlu 2006). Hepatik hücreler Karaciğerdeki hücre popülasyonunun yaklaşık % 80'ini oluştururlar. Hepatositler ortalama 20-35 mikron genişlediğinde, belirgin membrana sahip, altı veya daha fazla yüzeye sahiplerdir. Nadiren iki çekirdeğe sahip hücreler görülebilir. Düzgün yüzeyli olan çekirdek sferikal veya ovoiddir, boyutları hücreden hücreye farklılıklar

gösterebilir, bu farklılıklar poliploidi olması durumundan kaynaklanır. Çekirdekler veziküler tip olup dağınık kromatin granülleri içerir. Çekirdekçik bir veya birden fazla olabilir. Boyanması karaciğerdeki diğer hücelere göre daha açıktır. Olgun karaciğer hepatositlerinde mitozis olayı nadir görülür, olası bir hasardan sonra onarım sırasında birçok mitotik aktivite göstermektedir. Glikojen ve lipit depolanması yönünden fonksiyonel aktiviteye bağlı olarak hepatositlerin sitoplazması oldukça değişiklikler gösterir. Glikojen ve lipitler kesit hazırlanması sırasında genellikle hücreden uzaklaşırlar, kesitlerde düzensiz boşluklar (glikojen partikülleri) ve sferikal vakuoller (yağ damlacıkları) şeklinde görülürler. Sitoplazmayı düşük seviyede bazofilik yapacak derecede bütün hücelerde bazofil maddelere sahiptir. (Aytekin ve Solakoğlu 2006).

2.4 *Rattus Norvegicus*

Bilimsel çalışmalarda kemirgenler (Rodentia) sıklıkla tercih edilmektedir. Kemirgenlerin en çok tercih edilen grubu olan Wistar Albino, beyaz tüylü bir sıçan türüdür. *Rattus norvegicus* türünden köken almışlardır ve Rodentia takımının Muridae familyasında yer alırlar. *Rattus Rattus* ve *Rattus Norvegicus* türlerinden köken alırlar. Kafa yapıları geniştir (Gezer İnce ve Pazvant 2010). Uzun bir buruna ve yuvarlak kulaklara sahiptir. Uzun bıyıkları vardır. Görme duyuları güçlü değilken, işitme ve koku duyuları güçlüdür. Gözlerinin kafalarının yan tarafında bulunması, ratlara panoramik bir görüş açısı sağlar. Kesik üst dudakları, uzun dişleri ve sivri ağızları vardır. Uzun kuyrukları denge ve vücut ısının korunmasını sağlar. Farelerden farklı olarak safra keseleri yoktur. Bu yüzden safra direkt olarak kanallarla bağırsağa geçer. Tükrük bezleri major ve minor tükrük bezleri olarak ikiye ayrılır.

Tıp ve biyoloji alanında yapılan araştırmalarda sıklıkla tercih edilirler (Harkness ve Wagner 2010). Çoğunlukla geceleri aktiftirler. Laboratuvar ortamına çabuk uyum sağlarlar. Ortalama olarak 21 günde 8-11 adet yavru doğurabilirler. Bakımları kolay ve boyutları küçüktür.



Şekil 2.1 Rattus Norvegicus (<https://centaba.com/product/wistar-rats-albino/>)

Yapılan olan bu Yüksek Lisans tez çalışmasıyla Spinosad'ın hedef olmayan canlıların karaciğerine yapısal yönden etkisi ortaya konulmuştur. Böylece elde edilen bulguların literatürdeki kaynak eksikliğini ortadan kaldıracağı ve ileride yapılacak çalışmalara destek sağlayacağı düşünülmektedir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanlarının Bakımı

Deneylerde kullanılacak hayvanlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'ndan alındı. Deney, hayvanların 7 günlük bir karantina döneminden sonra başlatıldı. Hayvanlar, uygun çevresel koşullarda ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$; 12sa:12sa fotoperiyot, %60 nispi nem) her biri ayrı kafeslerde barındırıldı. Deney boyunca katı yemle ad libitum beslenecek ve suluklara erişimleri serbest bırakıldı (Sakai vd. 2004).

Sıçanlar yüksek doz eter ile feda edildi.

3.2 Hayvanlara Spinosad Uygulanması

Deneylerde kullanılan sıçanlar 14 gruba ayrılmıştır.

Grup 1 : Kontrol grubu (n=3) (Distile su verilen)

Grup 2 : Kontrol grubu (n=3) (E vitamini + zeytinyağı verilen)

Grup 3 : 24 saatlik 9 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 4 : 72 saatlik 9 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 5 : Bir haftalık 9 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 6 : 24 saatlik 9 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Grup 7 : 72 saatlik 9 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Grup 8 : Bir haftalık 9 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Grup 9 : 24 saatlik 37,38 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 10 : 72 saatlik 37,38 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 11 : Bir haftalık 37,38 mg/kg Spinosad (n=3) deney grubu

Grup 12 : 24 saatlik 37,38 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Grup 13 : 72 saatlik 37,38 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Grup 14 : Bir haftalık 37,38 mg/kg Spinosad + E vitamini (n=3) deney grubu

Denemelerde ikinci kontrol grubunda olan 0,5 ml/kg zeytinyağı içinde 200mg/kg E vitamini birlikte verildi. Bunun nedeni E vitamininin moleküler ve hücresel etkileri, antioksidan olarak reaktif oksijen türlerini ve nitrik oksiti temizlemek yanında spesifik enzimler ve transkripsiyon faktörleriyle de etkileşerek zarlar ve lipid alanları gibi hücresel yapıları korumaktır. E vitamini, hücre zarlarında bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin bütünlüğünü korur ve biyoaktivitelerini devam ettirir. E vitamini aynı zamanda, steroid hormon üreten dokularda yoğun olarak bulunur ve bu dokularda sitokrom p-450'nin oldukça duyarlı steroidojenik aktivitelerini lipid peroksidasyonuna karşı korur (Altın vd. 2017).

3.2 Işık Mikroskobu Preparasyonu

Sıçanlardan eter anestezisi ile alınan karaciğer örnekleri aşağıdaki yöntemle incelenmeye alındı:

- i. Çıkarılan karaciğer distile suyla yıkandı.
- ii. Yıkanan karaciğer örneklerinin %10' luk Metanolsüz Formaldehitte (0.1 M Sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış) ilk tespiti yapıldı (2 saat, +4 °C'de).
- iii. Tespit işleminden geçen örnekler fosfat tamponuyla yıkandı (1 saatte 3 kez solüsyon değişimi yapılarak)
- iv. Fiksasyon işlemlerinden sonra, örnekler çeşitli derecelerdeki alkol serilerinde (%80'lik, %90'lık %96'lık ve %100'lük) 60'ar dakika veya 5 dk bekletilerek dehidre edildi.
- v. Örnekler ksilolde (oda sıcaklığında) 15 dakika bekletildikten sonra parafin bloklarına gömüldü.
- vi. Parafin bloklarındaki örneklerden 5µm kalınlığında kesitler alındı.

3.4 Hematoksilen-Eosin Boyama Tekniği

Bütün lamlardaki fazla parafinin erimesi için bir gece 65°C de etüvde bekletilir.

15 dk 65 °C ksilol

15 dk oda sıcaklığında ksilol

10 dk %96 alkol

10 dk %90 alkol

10 dk %80 alkol

10 dk %70 alkol

10 dk Distile su

30 dk hematoksilen

1 dk distile su

1 dk eosin

5 dk %80 alkol

5 dk %90 alkol

5 dk %96 alkolden geçirildikten sonra dışarıda kurumaya bırakıldı. 15 dk ksilolde bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.5 DAPI Boyama Tekniği

Parafine gömülen dokuların 5µm kalınlığında kesitler alındı. Bütün lamlardaki fazla parafinin erimesi için bir gece 65°C’de etüvde bekletilir.

15 dk 65 °C ksilol

15 dk oda sıcaklığında ksilol

10 dk %96 alkol

10 dk %90 alkol

10 dk %80 alkol

10 dk %70 alkol

10 dk PBS uygulaması

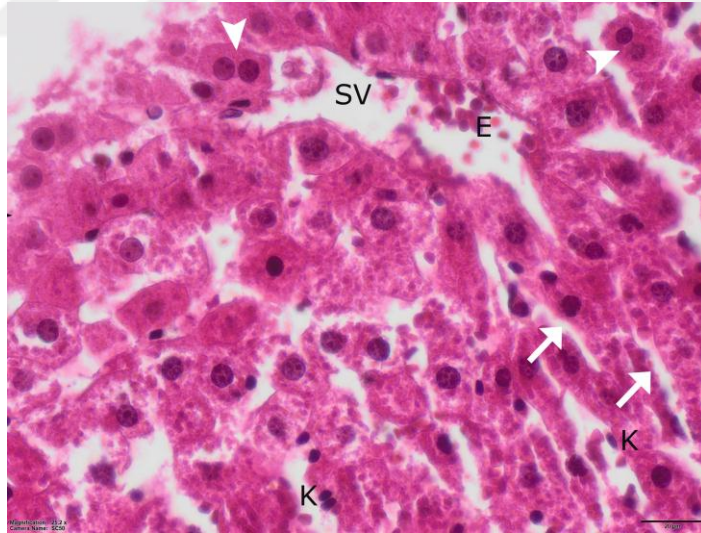
5 dk DAPI (4’-6-diamidino-2-phenylindole) boyama solusyonu

5 dk PBS ile yıkandıktan sonra gliserol ile kapatılarak floresan mikroskopta inceleme yapılır.

4. BULGULAR

Yapılan Yüksek Lisans Tez çalışmasında Spinosad'ın sıçanların karaciğerine histolojik yönden nasıl etki ettiği araştırıldı. Doku bütünlüğü, çekirdeğin morfolojik yapısı, çekirdek büyüklüğü, sitoplazmanın bütünlüğünü koruması ve hücrelerinin birbirine yakınlığı konusunda değişiklikler meydana geldiği ışık ve floresans mikroskopunda yapılan gözlemlerle tespit edildi.

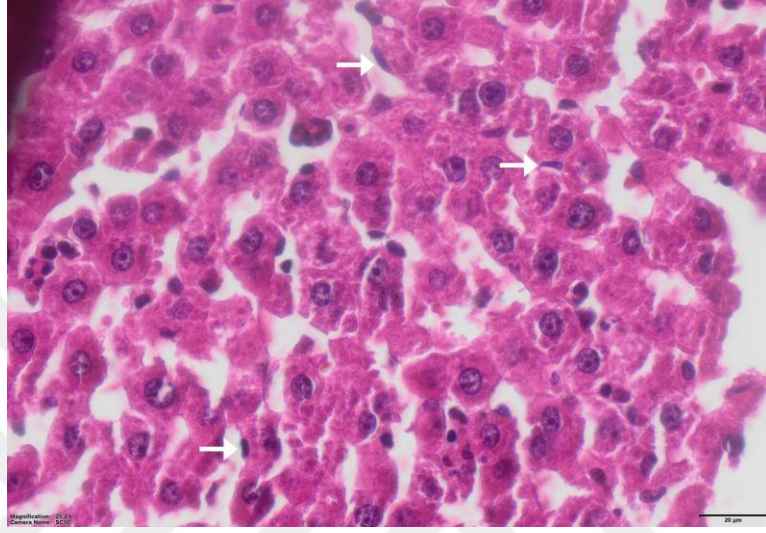
Distile su uyguladığımız 1. kontrol grubunda doku bütünlüğü korunmuştur. Hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskopunda karaciğer incelendiğinde, disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı. Hepatositler (karaciğer hücreleri) homojen aralıklarla yerleşmiştir. Hemen hemen bütün hepatositlerdeki çekirdeklerin eşit boyutlarda olduğu ve bazı hücrelerde çift çekirdeğin bulunduğu gözlenmiştir. Kan damarları, sinirler ve safra kanallarının bulunduğu sentral vende az sayıda eritrositler ve Kupffer hücreleri gözlenmiştir (Şekil 4.1).



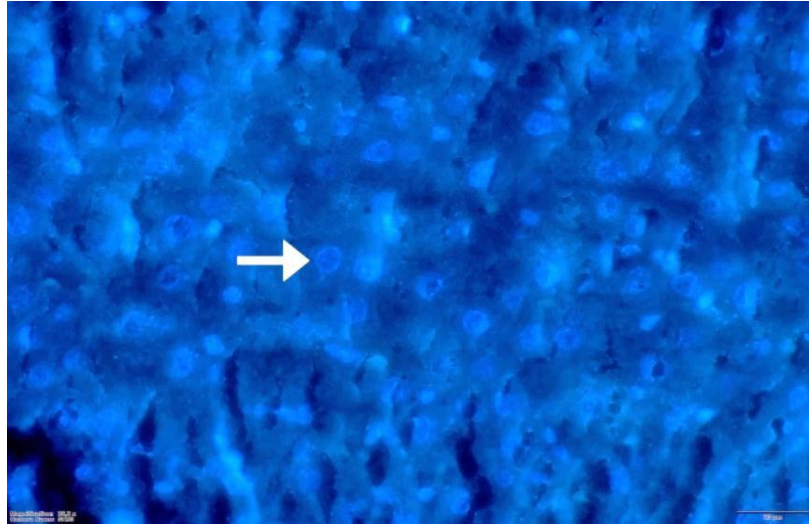
Şekil 4.1 Hematoksilen ve Eozin ile boyanan kontrol grubu sıçan karaciğeri. Eritrositler (E), disse aralığı (ok), sentral ven (SV), Kupffer hücresi (K), hepatositteki çift çekirdek (ok başı) x40

İkinci kontrol grubunda (E vitamini ve zeytinyağının birlikte uygulandığı sıçan grubunda) karaciğer hücrelerinin ışınal olarak yerleştiği gözlemlendi. Hücrelerdeki

çekirdeklerin boyutlarının aynı olduğu tespit edildi ve Disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı (Şekil 4.2). Floresans mikroskobunda karaciğer örnekleri DAPI boyasıyla boyanıp incelendiğinde hepatosit çekirdeklerinin normal yapıda olduğu ve hepsinin aynı boyutta olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).



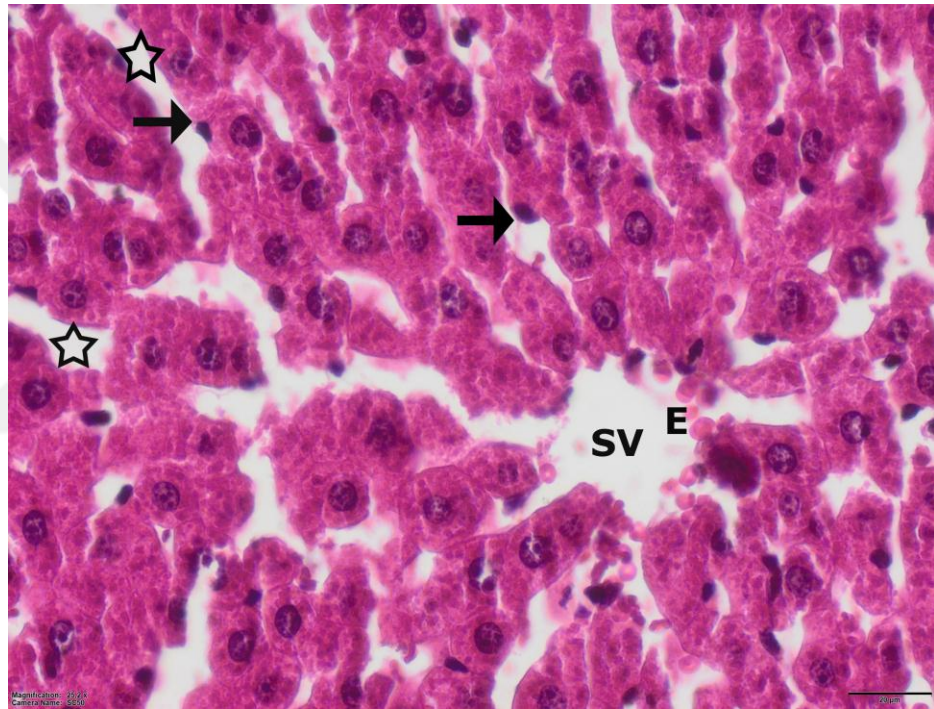
Şekil 4.2 Kontrol grubu sıçan karaciğerinin genel yapısı. Kupffer hücreleri (ok), H&E x40



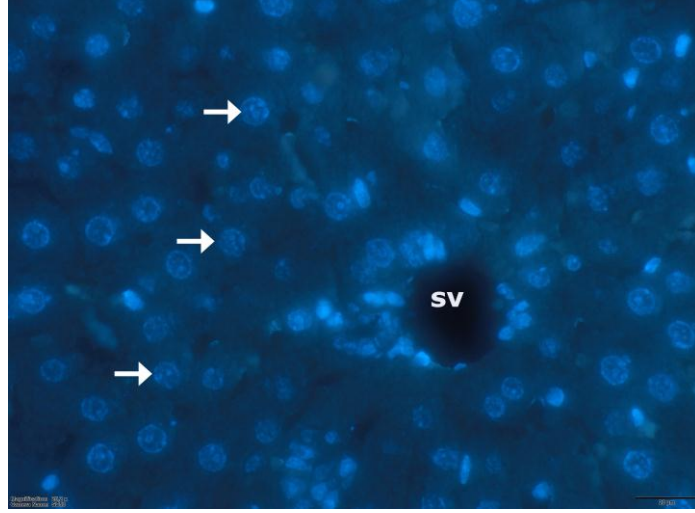
Şekil 4.3 DAPI boyası ile boyanan kontrol grubu sıçanların (E vitamini ve zeytinyağı verilen) karaciğerindeki hepatosit çekirdeklerinin morfolojileri ve boyutlarının görüntüsü. Hücre çekirdeği (ok) x40

Çalışmadaki 3.Grup olan 24 saat süreli 9 mg’lık Spinosad uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde kontrol grubu ile benzer yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Ancak H&E boyamasında sentral ven ve Disse aralıklarında nadiren Kupffer hücrelerine rastlandı (Şekil 4.4).

Spinosadın çekirdek yapısına etkisinin nasıl olduğunu gözlemek amacıyla yapılan histokimyasal teknikle incelemede (DAPI boyaması) çekirdek morfolojisi ve yerleşimi H&E boyamasında olduğu gibi benzer bulgular tespit edildi (Şekil 4.5).

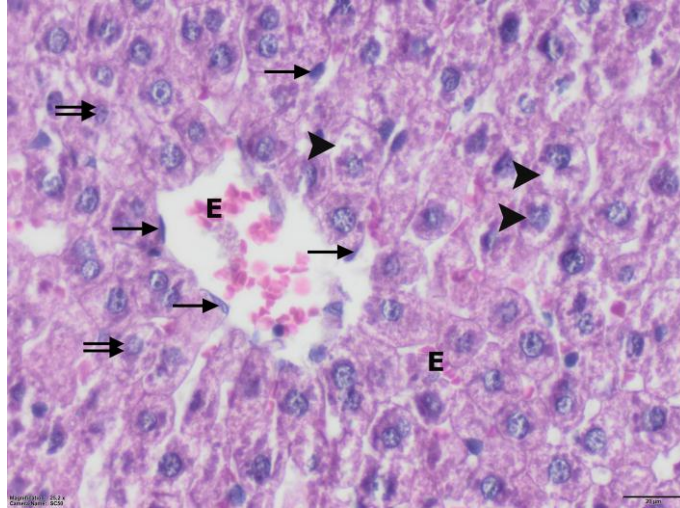


Şekil 4.4 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad uygulandıktan sonraki hematoksilin ve eozin ile boyanan sıçan karaciğerinin sentral ven ve çevresinin görüntüsü. Sentral ven (SV), Kupffer hücresi (ok), disse aralığı (yıldız), Eritrositler (E) x40

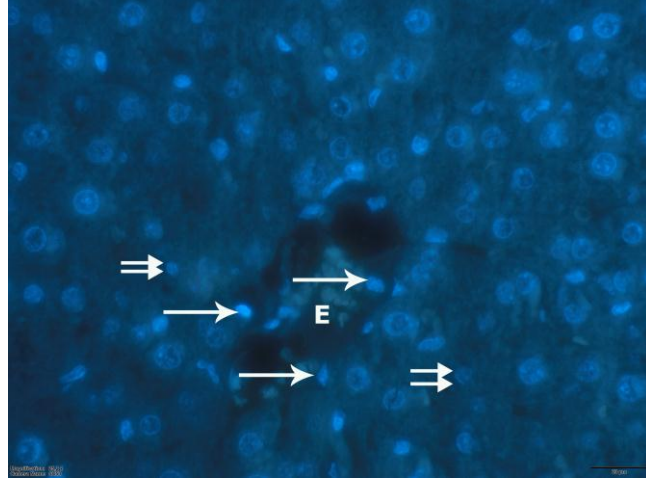


Şekil 4.5 DAPI ile boyanan 24 saat süreli 9 mg'lık Spinosad uygulanan sıçanlardaki hepatositlerin çekirdek morfolojisi (ok). Sentral ven (SV) x40

Çalışmadaki 4. Grup olan 9 mg Spinosad uygulamasından 72 saat sonra sıçanlardan alınan karaciğerlerin bazı hepatositlerde sitoplazma kaybı olduğu ışık mikroskopunda görüldü. Hem Sentral vende hem de Disse aralığında eritrosit yığınlarına ayrıca sentral vende birkaç Kupffer hücrelerine rastlandı. Bazı hepatositlerde çekirdek yapısının bozulduğu ve küçüldüğü görüldü (Şekil 4.6). Floresan mikroskopunda da DAPI boyamasıyla hazırlanan karaciğer örneklerinde de benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 4.7).

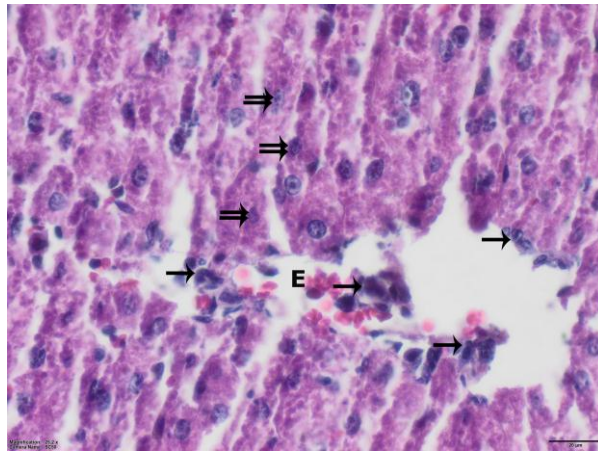


Şekil 4.6 Spinosad (9 mg) uygulamasından 72 saat sonra, sıçan karaciğerlerindeki hepatositlerde çekirdek küçülmesi (çift ok) ve sitoplazmik kayıp (ok başı), sentral vende eritrosit yığınları (E) ile Kupffer hücreleri (ok). H&E x40

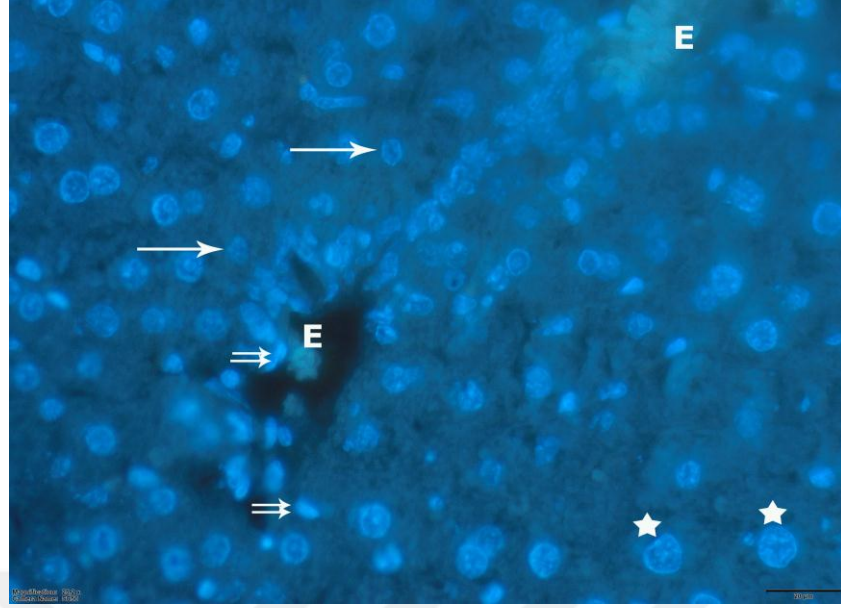


Şekil 4.7 Spinosad (9 mg) uygulanmış 72 saatlik sıçan karaciğerinin DAPİ boyamasıyla elde edilen Floresans mikroskobu görünümü. Hepatositlerde çekirdek küçülmesi (çift ok), sentral ven aralığındaki kümeleşmiş eritrositler (E), Kupffer hücresi (ok) x40

Çalışmadaki 5. Grup 9 mg / 1 hafta Spinosad dozu uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde kontrol grubunun karaciğer örneklerine göre ışık mikroskobunda H&E boyanmasında bazı hepatositlerdeki çekirdek boyutlarının küçüldüğü tespit edildi. Sentral vende çok sayıda Kupffer hücresi gözlemlendi (Şekil 4.8). Floresans mikroskobunda yapılan incelemelerde hepatosit çekirdeklerinin boyutlarında diğer çekirdeklere göre küçülme tespit edildi. Sentral ven aralığında eritrosit yığınlarına ve Kupffer hücrelerine rastlandı. Bazı hepatositlerde diğer çekirdek boyutlarına göre genişleme tespit edildi (Şekil 4.9).

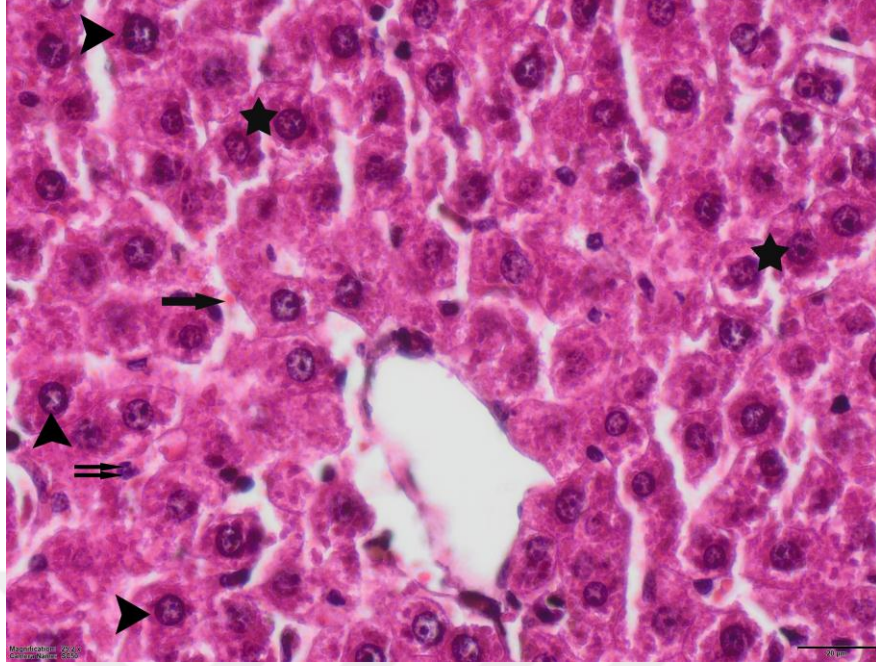


Şekil 4.8 Sıçanlara 9 mg Spinosad uygulandıktan 1 hafta sonra alınan karaciğer yapısı. Hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (çift ok), sentral ven aralığındaki Kupffer hücresi (ok), eritrositler (E). H&E x40

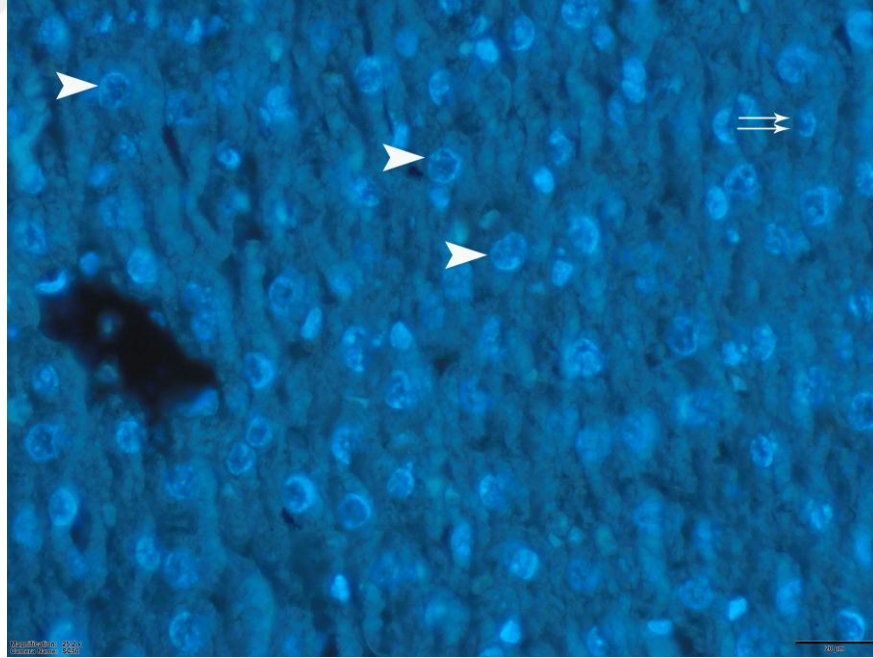


Şekil 4.9 Sıçanlara 1 hafta 9 mg Spinosad uygulandıktan sonra ve DAPI boyanan karaciğer dokusunun florasen mikroskoptaki sentral ven aralığındaki eritrositler (E), hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (ok), disse aralığındaki Kupffer hücresi (çift ok), hücre çekirdeğinde büyüme (yıldız) x40

Tez çalışmasının 6. deney grubundaki (9 mg Spinosad + E vitamini 24 saat uygulanan) karaciğerlerin hematoksilin ve eozin ile boyanması sonucunda Disse aralıklarında çok sayıda eritrositin olduğu ve hücrelerin birbiriyle temasının azaldığı ve uzaklaştığı tespit edildi. Bazı hepatositlerde sitoplazmik materyal kaybına rastlandı. Bazı hepatositlerin çekirdeklerinin küçüldüğü ve bazı çekirdeklerde kromatin yığını gözlemlendi (Şekil 4.10). Floresans mikroskopta elde edilen bulgulara göre hepatositlerdeki çekirdeklerin farklı boyutlarda olduğu dikkat çekti. Bazı hepatosit çekirdeklerine göre daha küçük olduğu gözlemlendi. Ayrıca bazı hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yığınları tespit edildi (Şekil 4.11).

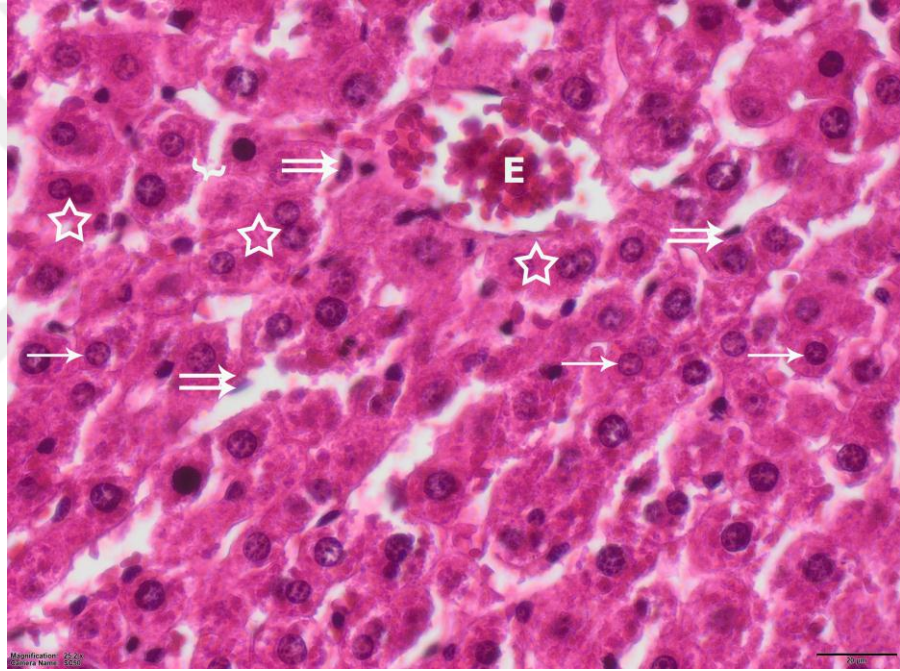


Şekil 4.10 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulandıktan sonra Hematoksilen-Eozin boyaması ardından karaciğer dokusunda görülen disse aralıklarındaki eritrositler (ok), hücre çekirdeğinin küçülmesi (çift ok) ve hücrelerin birbirinden ayrılması (yıldız), hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yığılması (ok başı) x40

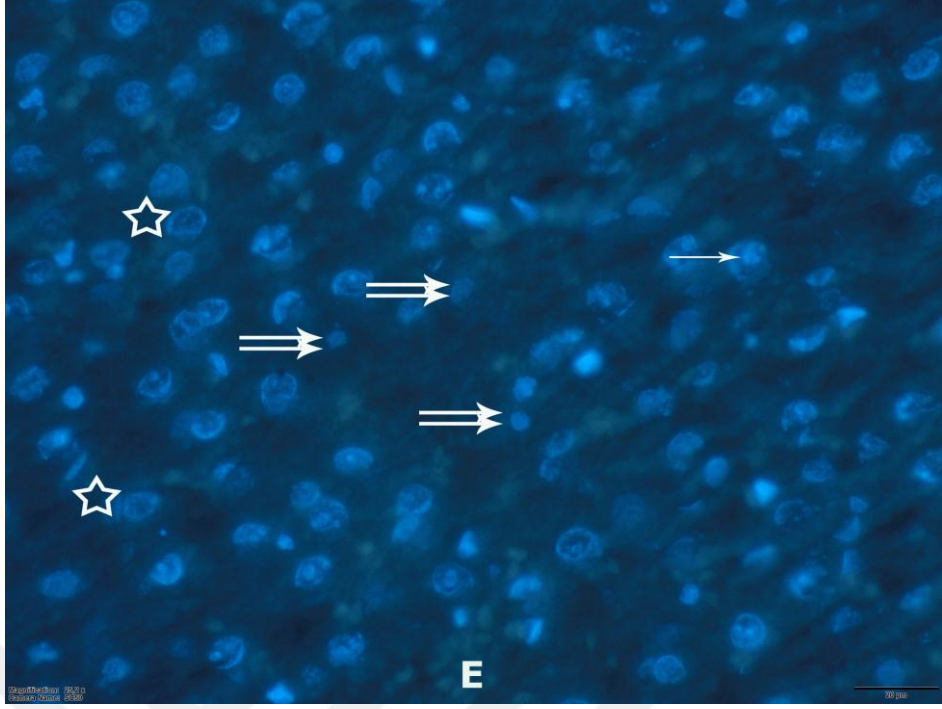


Şekil 4.11 Sıçanlara 24 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulanan karaciğer örneğinin floresans mikroskobu görüntüsü. DAPI boyamasında görülen hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığını (ok başı), bazı hepatositlerde küçülmüş çekirdek morfolojisi (çift ok) x40

Çalışmadaki 7. Grup olan 72 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulanan deney grubundaki sıçanların karaciğer dokusundan alınan kesitte (H&E) hepatosit çekirdeklerinin kontrol grubuna göre bariz küçüldükleri, sentral vende çok sayıda eritrosit gözlemlendi. Çift çekirdekli hepatosit sayısında artış ve disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı. Bazı hücrelerin birbirinden ayrıldığı ve bazı hücrelerinde sitoplazmasında kayıp olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). DAPI boyamasında ise sentral vende çok sayıda eritrositler tespit edildi. Hepatositlerdeki çekirdeklerde kromatin yığılması, çekirdek boyutlarında farklılık ve çekirdekçiklerde büyüme gözlemlendi (Şekil 4.13).

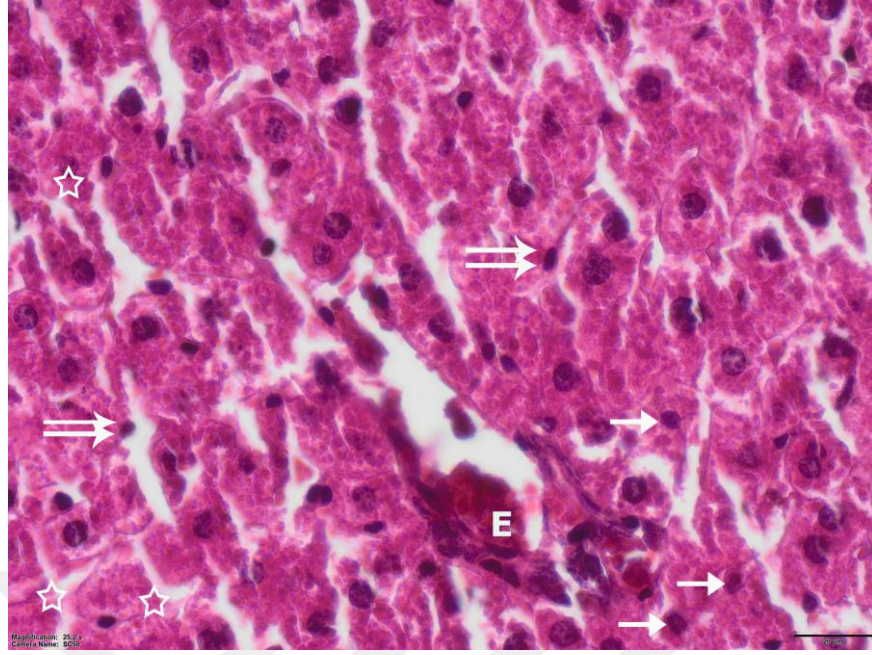


Şekil 4.12 72 saatlik 9 mg Spinosad + E vitamini uygulaması ardından sıçanlardan alınan karaciğer hepatositlerindeki çekirdeğin küçülmesi (ok), hepatositlerin birbirinden uzaklaşması ({}), hepatositteki çift çekirdek (yıldız), sentral vende eritrosit yığını (E), disse aralıklarındaki Kupffer hücreleri (çift ok). H&E x40



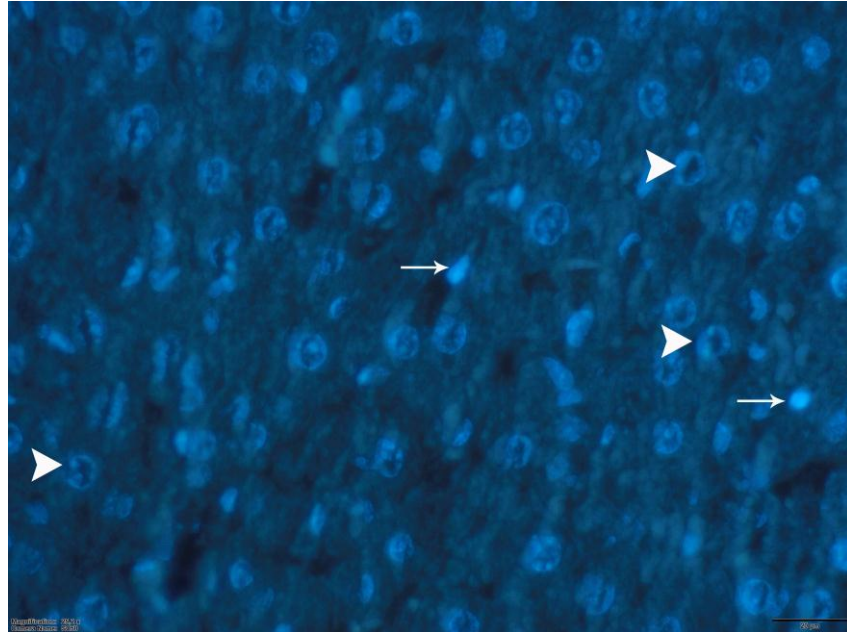
Şekil 4.13 72 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulaması ardından sıçanların karaciğer dokusunun DAPI boyama ile boyanan hepatositlerin çekirdeklerinde küçülme (çift ok), hepatosit çekirdekçiklerinin büyümesi (ok), hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığılını (yıldız), sentral vende eritrositler (E) x40

Çalışmada 8. Deney grubunun son grubu olan 1 hafta 9 mg Spinosad + E vitamini uygulanan sıçanların karaciğerlerinden alınan dokularında hücrelerin birbirinden ayrıldığı, çekirdek ebatlarında değişiklikler, sentral vende eritrositlerin çöktüğü, hücrelerin sitoplazmasında erime ve Disse aralıklarında çok sayıda Kupffer hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 4.14).



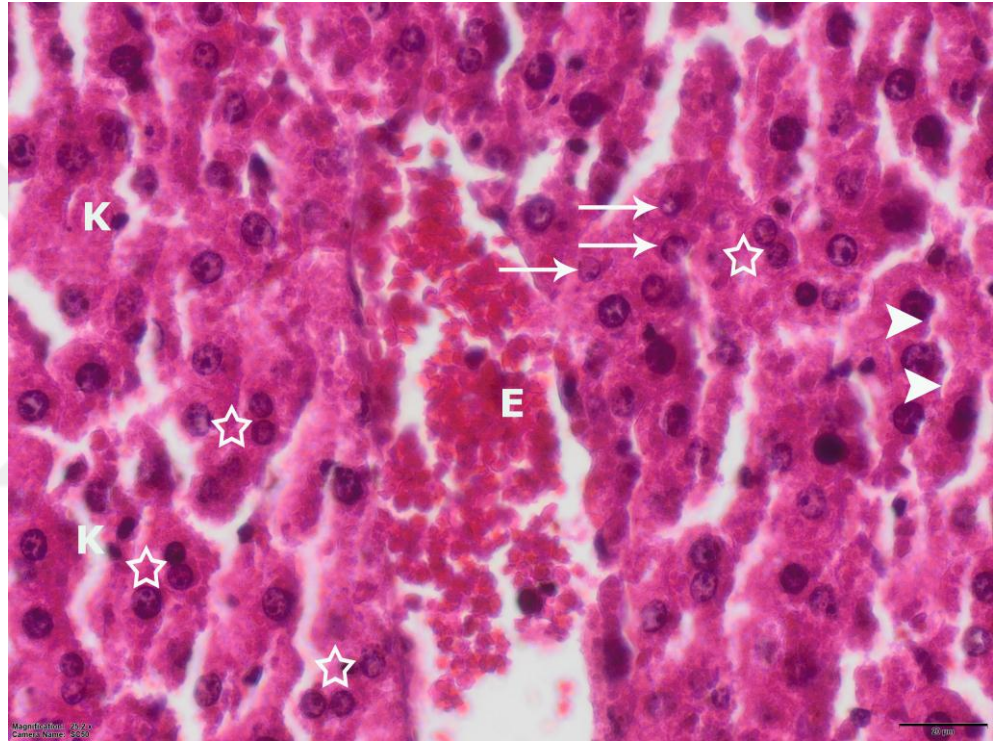
Şekil 4.14 Bir haftalık 9 mg Spinosad + E vitamini uygulemiş karaciğer örneği. Hepatositlerde çekirdek küçülmesi (ok), Disse aralığında Kupffer hücreleri (çift ok), hücrelerin birbirinden uzaklaşması (yıldız), sentral vende eritrosit yığılı (E) H&E x40

Floresans mikroskobunda bazı hücrelerin çekirdeklerinde kromatin yığılıması ve Disse aralıklarında Kupffer hücreleri tespit edildi (Şekil 4.15).

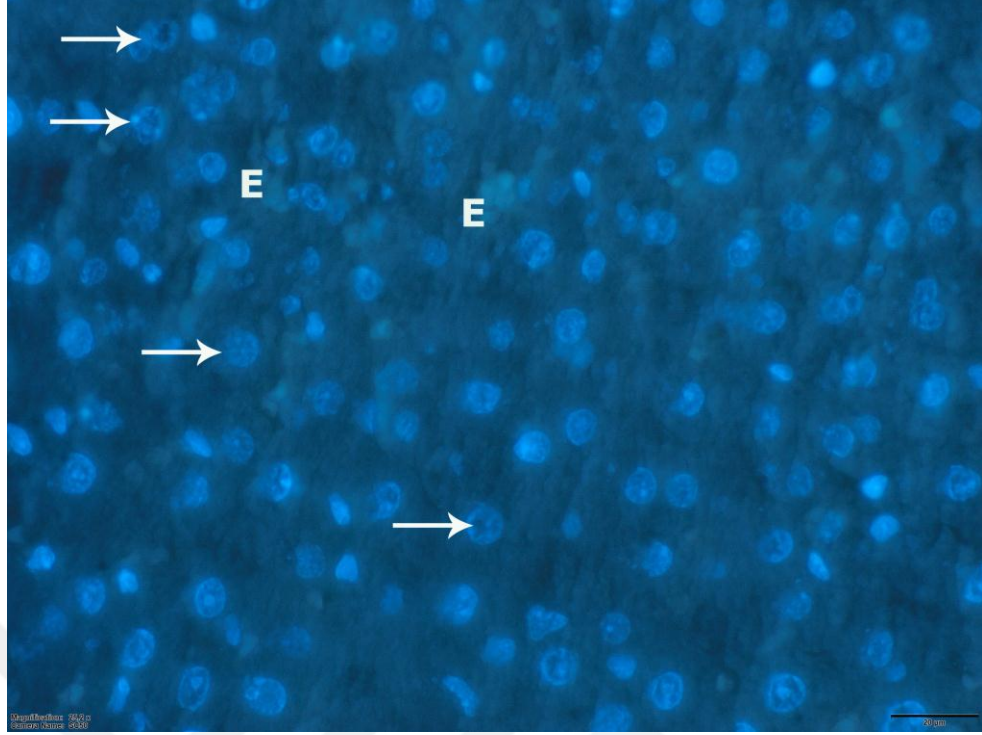


Şekil 4.15 Hepatositlerin çekirdeğinde kromatin yığılıması (ok başı), Disse aralıklarında Kupffer hücreleri (ok) x40

Çalışmadaki 9. Deney grubu olan 24 saat süreli 37,38 mg'lık Spinosad uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer dokusundan alınan kesitlerde hücrelerin çekirdeklerinin küçüldüğü ve çoğu hepatositlerde çift çekirdeğe rastlandı. Hepatositlerin birbirinden uzaklaştığı ve Disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı Sentral vende yoğun eritrosit yığını tespit edildi. (Şekil 4.16). Floresans mikroskobunda, hücre çekirdeklerinin içinde kromasentrum yığınlarına rastlandı ve disse aralığında eritrosit yığınları tespit edildi (Şekil 4.17).

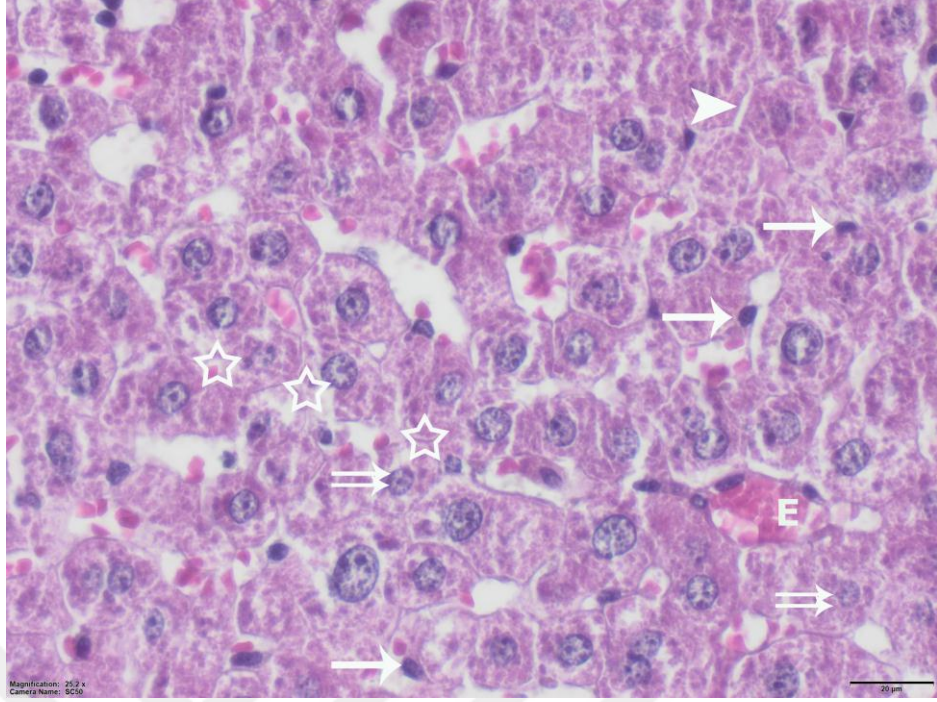


Şekil 4.16 Işık mikroskobunda hepatositlerin çekirdeklerinin küçülmesi (ok), hepatositlerin birbirinden uzaklaşması (ok başı), hepatositlerde çift çekirdek (yıldız), sentral vende eritrosit yığını (E), Disse aralıklarında Kupffer hücreleri (çift ok) H&E x40

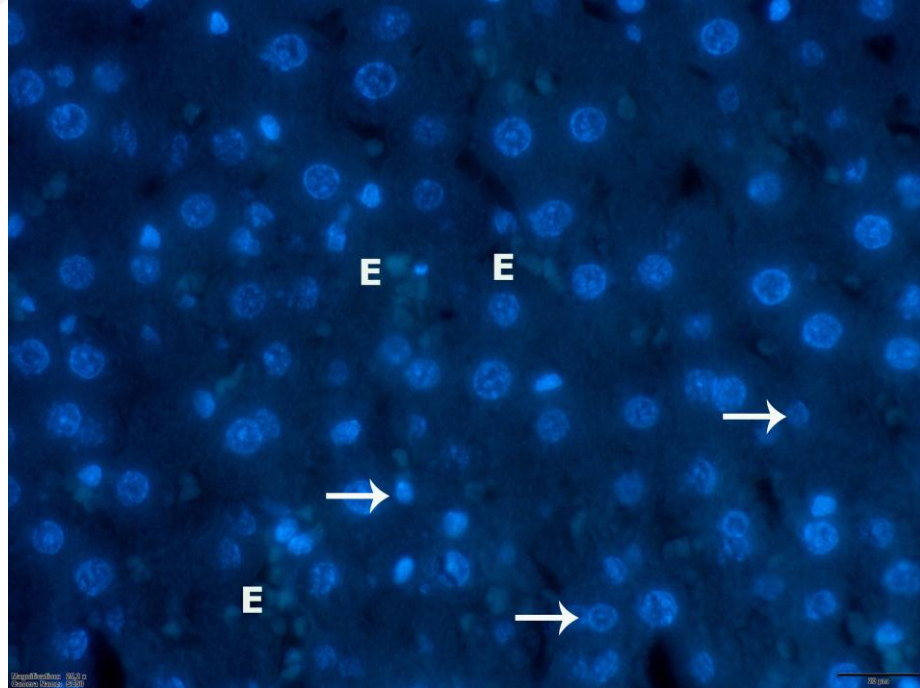


Şekil 4.17 Floresans mikroskobunda hepatositlerde kromatin yığını (ok), Disse aralıklarında eritrositler (E). DAPI boyası x40

Çalışmada 10. Grup olan 37,38 mg Spinosad uygulanan sıçanlardan 72 saat sonra alınan karaciğerlerde ışık mikroskobunda hepatositlerin yerleşiminde uzaklaşmalar ve kopmalar tespit edildi. Ayrıca bazı hepatositlerin çekirdek boyutlarında diğer hücrelere göre küçülmelere, hepatositlerin sitoplazmalarında erime tespit edilmiştir. Sentral vende eritrositler gözlenmiştir. Disse aralıklarında da eritrositlere ve Kupffer hücrelerine rastlanmıştır (Şekil 4.18). Floresans mikroskobunda da bazı hepatositlerin çekirdeklerinde küçülme ve hepatositlerin birbirinden uzaklaşması gözlenmiştir. Disse aralıklarında da çok sayıda eritrositlere rastlanmıştır (Şekil 4.19).

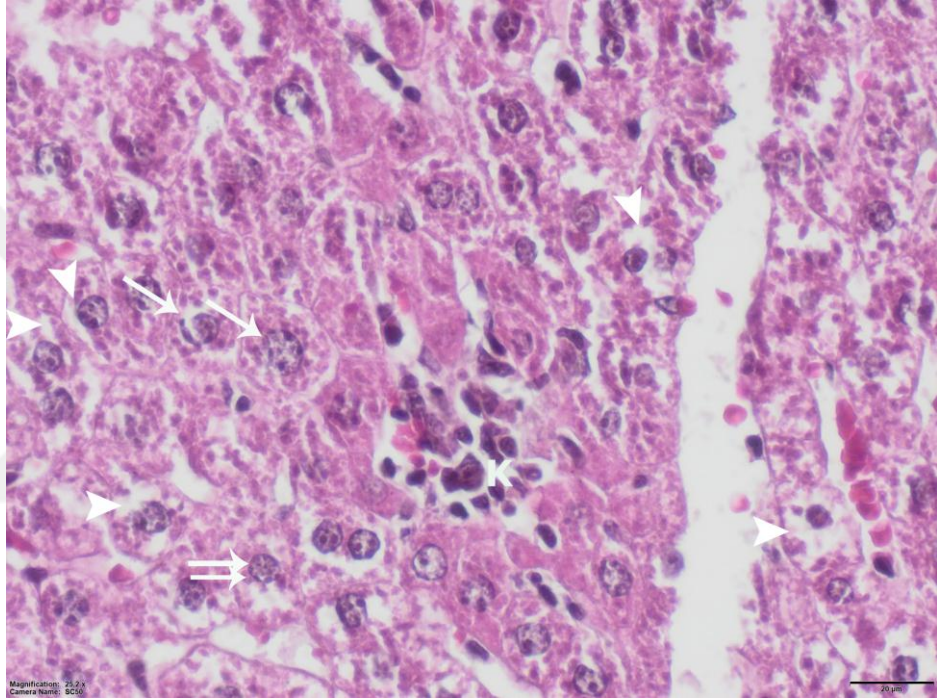


Şekil 4.18 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad dozlu karaciğer dokusunun ışık mikroskopunda (Hematoksilen – Eosin) boyanan hepatositlerin birbirinden uzaklaşması (ok başı), hepatosit çekirdeğinin küçülmesi (çift ok), hepatosit sitoplazmasında erime (yıldız), sentral vende eritrositler (E), disse aralıklarında Kupffer hücreleri (ok) x40

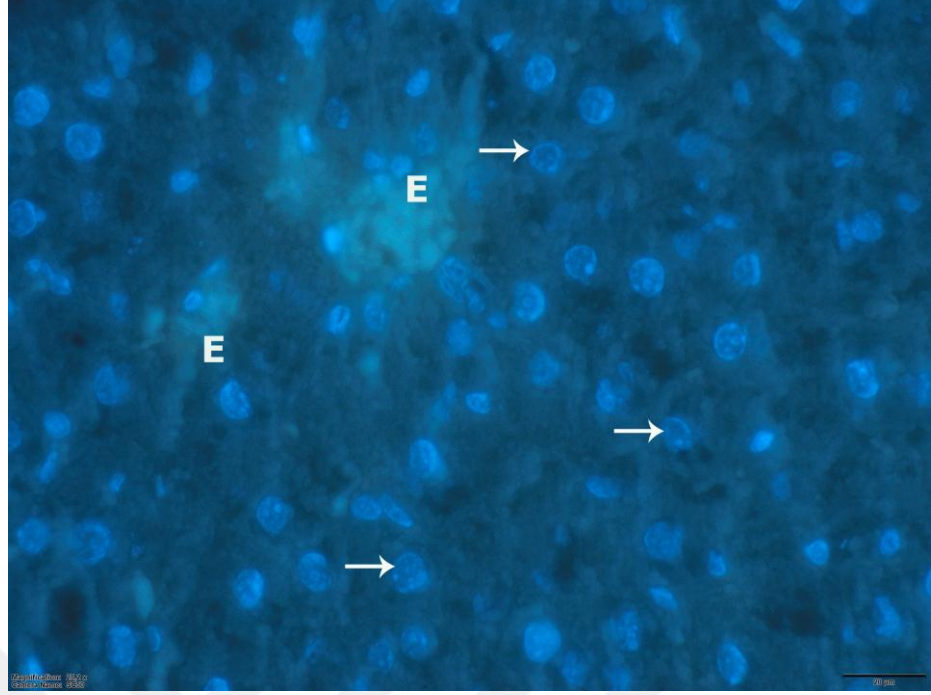


Şekil 4.19 Floresans mikroskopunda 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad dozu verilen DAPI ile boyanan hepatositlerin çekirdeklerinin küçülmesi (ok), Disse aralıklarındaki eritrositler (E) x40

Çalışmadaki 11. Grup 37,38 mg / 1 hafta Spinosad dozu uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde ışık mikroskopundaki hepatositlerin genelinde sitoplazma materyalinde erimeler gözlemlendi. Hepatosit çekirdeklerinin morfolojisinde bozulmalar, hepatositlerde kromatin yığınları tespit edildi. Disse aralıklarında bol sayıda Kupffer hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.20). Floresans mikroskopunda da hepatosit çekirdeklerinin boyutları genel olarak aynı ve hepatositlerde kromatinin yığın halinde çöktüğü gözlemlendi. Disse aralığında ve sentral vende eritrosit sayısında artış tespit edildi (Şekil 4.21).

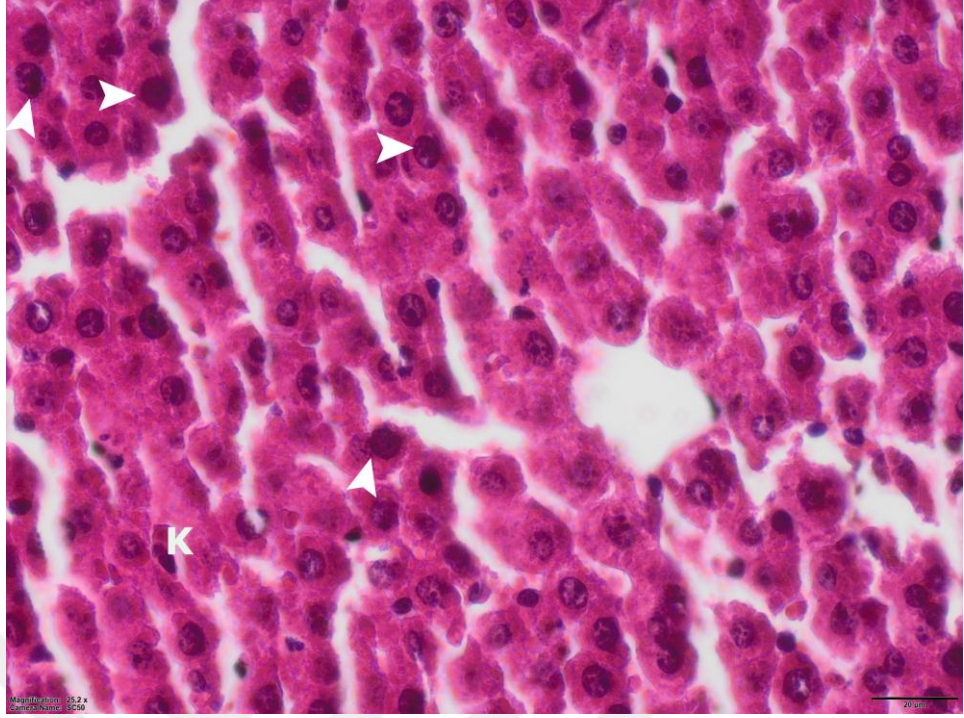


Şekil 4.20 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad dozu uygulanan hepatositlerin sitoplazmasındaki kayıp (ok başı), hepatosit çekirdeğinin morfolojisindeki bozulma (ok), hepatosit çekirdeğindeki kromatin yığını (çift ok), disse aralığındaki Kupffer hücresi (K) H&E x40

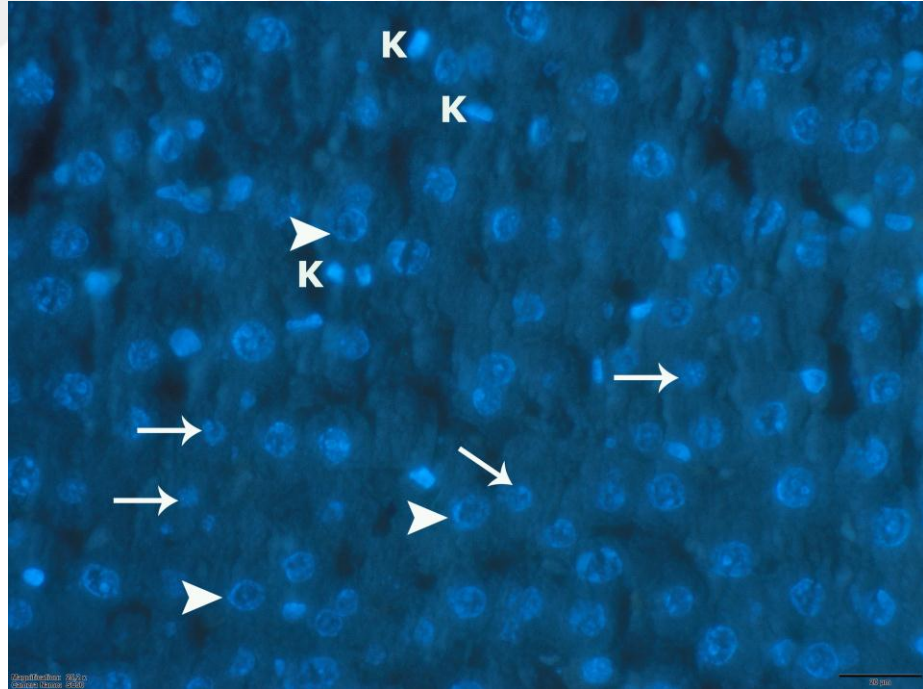


Şekil 4.21 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad dozu uygulanan karaciğer örneklerinde floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerin aynı boyutlardaki çekirdekler (ok), disse aralıklarında ve sentral vende eritrositler (E) x40

Çalışmadaki 12. deney grubu 37,38 mg Spinosad + E vitamini dozlu sıçanların 24 saat süreli olanlarından disekte edilmiş karaciğerlerinden alınan örneklerin ışık mikroskopunda H&Eosin ile boyanan hepatositlerin çekirdek ebatlarında bariz bir değişiklik olmadığı ancak bazı hepatositlerde küçüldüğü tespit edilmiştir. Hepatositlerin sitoplazmik kayıba uğramadığı gözlemlendi. Sentral vende ve disse aralığında eritrositlerin ve Kupffer hücrelerinin varlığına az sayıda rastlanmıştır (Şekil 4.22). Floresans mikroskopunda da genel olarak bakıldığında hepatositlerin düzgün yapıda olduğu ancak bazı hepatositlerin çekirdeklerinin küçük olduğu gözlemlenmiştir. Hepatositlerin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Disse aralıklarında Kupffer hücreleri ve eritrositler yok denecek kadar az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

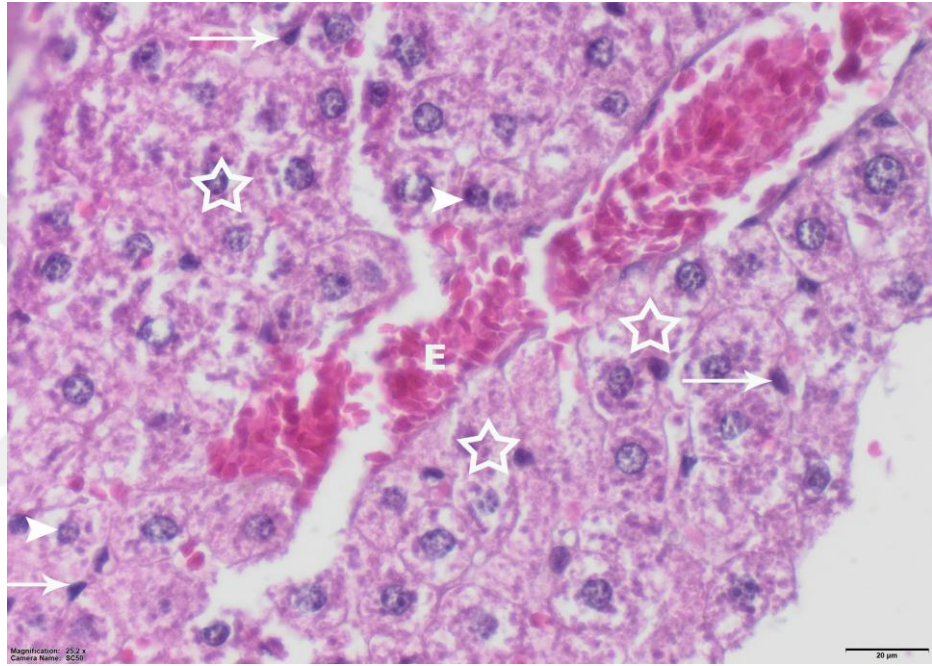


Şekil 4.22 Işık mikroskopunda 37,38 mg + E vitamini / 24 saat Spinosad dozu uygulanan karaciğer histolojisi. Hepatosit çekirdeklerinde kromatin yığılması (ok başı)Disse aralığındaki Kupffer h  resi (K) H&E x40

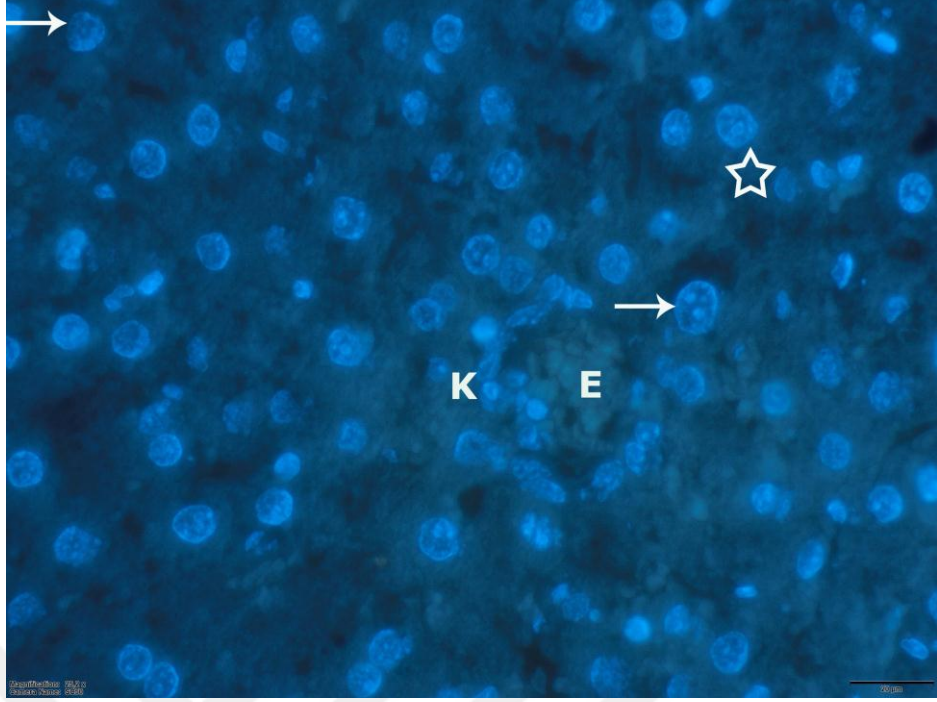


Şekil 4.23 37,38 mg / 24 saat Spinosad dozu uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositteki çekirdek kü  lmesi (ok),   ekirdeklerde kromatin yığılması (ok başı) Disse aralığındaki Kupffer h  resi (K) x40

Çalışmadaki 13. Deney grubunda 72 saat sonunda 37,38 mg Spinosad + E vitamini dozlu sıçanlardan disekte edilen karaciğer örnekleri ışık mikroskopunda (Hematoksilen – Eosin) boyanan hepatositlerin sitoplazmasında kayıp gözlenmiştir. Disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı. Sentral vende fazla sayıda görülen eritrositler ve Kupffer hücreleri rastlanıldı (Şekil 4.24). Floresans mikroskopunda da bazı hepatositlerin çekirdek morfolojisinde bozulmalar ve sentral vende fazla sayıda eritrosit ve Kupffer hücreleri tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

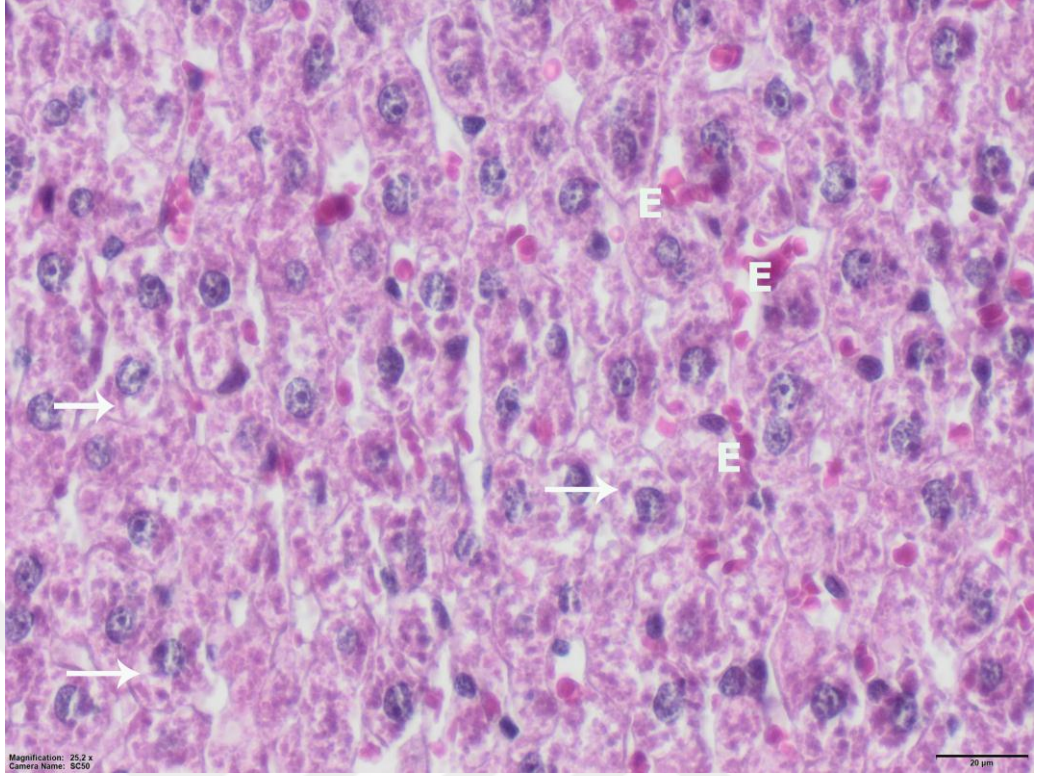


Şekil 4.24 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan karaciğer örneğinde Hematoksilen – Eosin ile boyanan hepatosit sitoplazmasında erime (yıldız), disse aralığındaki ve sentral vendeki Kupffer hücresi (ok), sentral vendeki eritrositler (E) x40

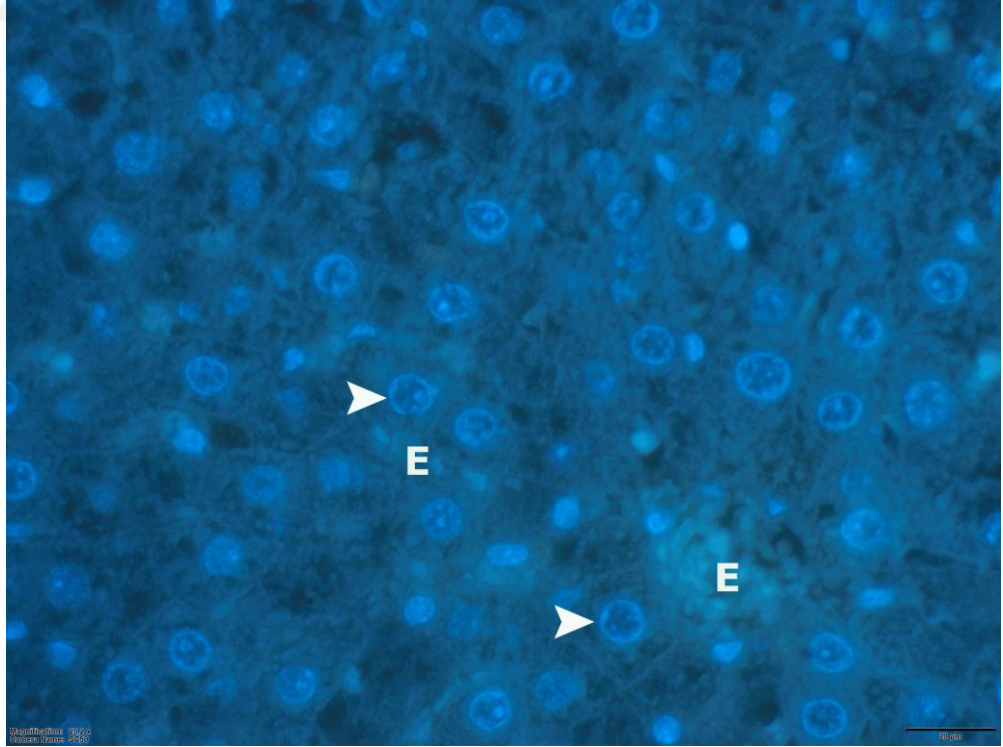


Şekil 4.25 72 saat süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerin çekirdeğindeki morfolojik bozulma (yıldız), hepatosit çekirdeğinde aşırı büyüme (ok), sentral vende eritrositler (E) ve Kupffer hücresi (K) x40

Çalışmada 14. deney grubunun 1 hafta süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini dozlu sıçan karaciğer örneğinin ışık mikroskopunda (Hematoksilen – Eosin) boyanan hepatositlerin sitoplazmalarında kayıp, çekirdeklerinde de kromatin kaybı ve parçalanma gibi morfolojik bozukluklar gözlenmiştir. Disse aralığında da fazla sayıda eritrosiler tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Floresans mikroskopunda da hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yığınları, sentral vende ve disse aralığında eritrositlere rastlanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.26 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan ışık mikroskopunda hepatositlerdeki sitoplazma kaybı (ok), disse aralığındaki eritrositler (E) x40



Şekil 4.27 Bir hafta süreli 37,38 mg Spinosad + E vitamini uygulanan floresans mikroskopunda DAPI boyasıyla boyanan hepatositlerdeki kromatin yığılını (ok başı), sentral ven eritrositler (E) x40

Çizelge 4.1 Spinosad uygulamasından sonra deney hayvanlarının (14 sıçan grubu) karaciğerindeki hücresel hasarların karşılaştırılması

	Hepatosit Çekirdek Küçülmesi	Hepatosit Çekirdek Bozulması	Sitoplazma Kaybı	Kromatin Çökmesi	Sentral Vende Eritrosit	Disse Aralığında Eritrosit	Sentral Vende Kupffer Hücreleri	Disse Aralığında Kupffer
1) Kontrol grubu	-	-	-	-	+	-	+	+
2) Zeytinyağı + E vitamin grubu	-	-	-	-	-	-	-	+
3) 24 saat 9 mg Spinosad	-	-	-	-	-	-	+	+
4) 72 saat 9 mg Spinosad	+	+	+	-	+	+	+	-
5) 1 hafta 9 mg Spinosad	+	-	-	-	+	-	+	-
6) 24 saat 9 mg Spinosad + E vitamini	+	-	+	+	-	+	-	-
7) 72 saat 9 mg Spinosad + E vitamini	+	-	+	+	+	-	-	+
8) 1 hafta 9 mg Spinosad + E vitamini	+	-	+	+	+	-	-	+
9) 24 saat 37,38 mg Spinosad	+	-	-	+	-	+	+	+
10) 72 saat 37,38 mg Spinosad	+	-	+	-	+	+	-	+
11) 1 hafta 37,38 mg Spinosad	-	-	+	+	+	+	-	+
12) 24 saat 37,38 mg Spinosad + E vitamini	+	-	-	-	+	+	+	+
13) 72 saat 37,38 mg Spinosad + E vitamini	-	+	+	-	+	-	+	+
14) 1 hafta 37,38 mg Spinosad + E vitamini	-	+	+	+	+	+	-	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan Yüksek Lisans Tez çalışması sonucunda Spinosadın (SPD) sıçan karaciğeri yapısına 9 mg ve 37.38 mg'lık dozlarının hasar verici yönde etki ettiği ışık ve floresan mikroskobunda gözlemlendi.

Sonuç olarak yapılan Yüksek Lisans Tez çalışması Spinosadın iki farklı doz uygulaması sonucunda karaciğere 72 saat sonra hasar verici yönde etkili olduğunu gösterdi. Çoğu makalede bu tür pestisitlerin enzim açısından biyokimyasal etkileri rapor edilmiştir. Yapılan Tez çalışması hücresel yönden de organların hasar gördüğünü öne süren az sayıdaki çalışmalardan birisidir. Pestisitlerle yapılacak mücadelelerde uyguladığımız dozların dikkate alınacağı ve bu konuda yapılacak olan çalışmalara kaynak olacağı düşünülmektedir.

Çalışmadaki 4. Grup olan 9 mg Spinosad uygulamasından 72 saat sonra sıçanlardan alınan karaciğer dokusunda bazı hepatositlerde çekirdek yapısının bozulduğu ve küçüldüğü gözlemlendi. Hepatositlerdeki çekirdek küçülmesi sebebinin, spinosadın toksik etkisi nedeniyle kromatin azalmasının olabileceği ve hücrenin nekroza uğradığı düşünüldü (Şekil 4.6).

Çalışmadaki 5. Grup 9 mg / 1 hafta Spinosad dozu uygulanan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde kontrol grubunun karaciğer örneklerine göre ışık mikroskobunda H&E boyanmasında bazı hepatositlerdeki çekirdek boyutlarının küçülmesi Spinosad nedeniyle hücrenin nekroza uğradığını düşündürdü (Şekil 4.8). Bazı hepatositlerde diğer çekirdek boyutlarına göre genişleme tespit edildi (Şekil 4.9). Bu durum, spinosada karşı antioksidant enzim sentezinin artmış olabileceğini düşündürdü.

Çalışmadaki 7. Grup olan 72 saat 9 mg Spinosad + E vitamini uygulanan deney grubundaki sıçanların karaciğer dokusundan alınan kesitte DAPI boyanmasında ise sentral vende çok sayıda eritrositler tespit edildi. Bu kanama olabileceği düşünüldü (Şekil 4.13).

Çalışmadaki 12. deney grubu 37,38 mg Spinosad + E vitamini dozlu sıçanların 24 saat süreli olanlarından disekte edilmiş karaciğerlerinden alınan örneklerin ışık mikroskobunda H&Eosin ile boyanan hepatositlerin çekirdek ebatlarında bariz bir değişiklik olmadığı ancak bazı hepatositlerde küçüldüğü tespit edilmiştir. Hepatositlerin sitoplazmik kayıba uğramadığı gözlemlendi. Bu sonuca bakarak E vitaminin koruyucu özelliği olduğu düşünüldü (Şekil 4.22).

Çalışmadaki 13. Deney grubunda 72 saat sonunda 37,38 mg Spinosad + E vitamini dozlu sıçanlardan disekte edilen karaciğer örnekleri ışık mikroskobunda (Hematoksilen &Eosin) boyanan hepatositlerin sitoplazmasında kayıp gözlenmiştir. Disse aralıklarında Kupffer hücrelerine rastlandı. Sentral vende fazla sayıda görülen eritrositler ve Kupffer hücreleri rastlanması kanama olabileceği gözlemlendi (Şekil 4.24).

Tuğyan ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada bir organofosfatlı pestisit olan malathion uyguladıkları farelerin böbrek dokularının çoğunda ışık mikroskobu düzeyinde böbrek kanallarının lümenlerinde eritrosit kümelerinin olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız organofosfat grubunda kabul edilen Spinosad sıçanların karaciğerinde sentral ven ve Disse aralıklarında eritrosit yığınlarının oluşmasına sebep olmuştur ve dolayısıyla bu yönden Tuğyan ve arkadaşlarının (2005) tespit ettikleri bulgu ile benzerlik göstermektedir.

El-Shenawy ve arkadaşları (2010) organofosfatlı insektisit olan diazinonun (DZN) farelerin karaciğerine etkisini ve hepatotoksisiteye karşı E vitamininin koruyucu etkisini hem hücresel hem de antioksidant enzim seviyeleri yönünden incelemişlerdir. Endojen antioksidan enzimlerdeki değişikliklerle birlikte belirgin şekilde düşük GSH seviyeleri ve artan LPO seviyelerinin doza bağımlı olan DZN'nin hepatik toksisitesinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Viatmin E uygulamasının diazinonun neden olduğu karaciğer hasarını koruyan ajan olarak hareket edebileceğini öne sürülmüştür. E vitamininin karaciğer hasarını önlediği çalışmamızda da gözlenmiştir.

Uzunhisarcıklı ve Kalender (2011) erkek ratlara metilparation, C+E vitamini ve metilparation/C+E vitamini dozlarını hergün oral gavaj yolu ile 7 hafta uygulamışlardır.

Elektron mikroskobu ile yaptıkları gözlemlerde organofosfatlı insektisit olan metilparationun sitopatolojik değişimlere neden olduğunu sıçan karaciğerinde tespit etmişlerdir. C+E vitaminlerini hepatotoksisiteyi azalttığı ancak tamamen ortadan kaldırmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda E vitamini uygulamasının Spinosad sıçan karaciğerindeki hasarını kısmen düzelttiği Uzunhisarcıklı ve Kalender'in (2011) bulgularına benzer bulgulardır.

Aboul-Enein ve ark., (2012) spinosadı sıçanlara uyguladıktan dört hafta sonra aldıkları karaciğer organlarında asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. Karaciğer morfolojisini gözlemek için yaptıkları histolojik çalışmalarda, verdikleri LD50'nin 1/20'si kadar uygulanan SPD dozunun, hepatositlerde vakuol oluşumuna ve dejeneratif değişikliklere sebep olduğunu tespit etmişlerdir (Aboul-Enein ve ark., 2012). Bizim yaptığımız çalışmada ise 72 saat süreli 9 mg ve 37.38 mg doz Spinosad uygulanan sıçanların karaciğer hepatositlerinde sitoplazmik kayıp, çekirdeklerinin morfolojisinde bozulmalar ve diğer çekirdeklere göre bazılarında küçülmeler tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak Spinosad'ın toksik etkisi nedeniyle kromatin azalmasının olabileceği ve hücrenin nekroza uğradığı düşünüldü.

Çakıcı ve Akat (2013), yaptıkları çalışmada diazinonun sıçan karaciğer ve böbreklerine yapısal yönden etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada sıçanların karaciğerindeki hepatositlerde vakuol oluşumu, mononükleer infiltrasyon, genişlemiş damar yapısı ve Disse aralığında çok sayıda Kupffer hücrelerine rastlanmıştır. Kupffer hücrelerinin fazla olması yönünden Spinosad, çalışmamızdaki deney hayvanlarının karaciğerinde de Kupffer hücrelerinin yoğun görünmesine neden olmuştur.

Eren ve ark., (2017) klorprifosun (organofosfat grubunda) Wistar albino ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada testis dokusuna hasar verdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda klorprifosunun testis dokusundaki seminifer tübüllerde dejenerasyon, spermatogenik hücrelerde azalma ve seminifer tübüller arasındaki bölgede nekrozis gibi değişiklikler gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak, spinosad uyguladığımız karaciğer hepatositlerinin bazılarında nekrozis gözlemlendi.

Ravikant ve ark., (2018) kuşların karaciğerine spinosad uyguladıklarında belirgin olarak lezyonlar ve sentral vende tıkanıklık, hepatositlerde bozulmalar ve sinüzoidlerin genişlediğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmada Ravikant ve arkadaşlarının tespit ettiği bulgulara benzer olarak hepatositlerde bozulmalar ve sentral ven de eritrositlerin varlığına bağlı olarak kanamalar tespit edildi.

Yapılan tez çalışmalarının sonuçlarının organofosfatlı bileşiklerin zararlarını inceleyen araştırmacılara kaynak olacağı ve karaciğer yapısı bozuklukları ile yapılan çalışmalara bilimsel yönden destek olacağı kanısındayız.



KAYNAKLAR

- Aboul-Enein, Ahmed M., Aboul-Soud, Mourad A. M., Said, Hamed K., Ali, Hanaa F. M., Ali, Zeinab, Y., Mahdi, Amany M. and Giesy and John P. 2012. Hepatoprotective effects of antioxidants against non-target toxicity of the bio-insecticide spinosad in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(8); 550-559.
- Alibaba.2020. Web sitesi: turkish.alibaba.com, Erişim Tarihi: 24.09.2020
- Altınar, A., Atalay, H. ve Bilal, T. 2017. Bir Antioksidan Olarak E Vitamini. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(3); 149-157.
- Aytekin, Y. ve Solakoğlu, S. 2006. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, s. 46-48, 332-344, İstanbul.
- Bond, J.G., Marina C.F. and Williams, T. 2004. The naturally derived insecticide Spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Med. Vet. Entomol.*, 18; 50-56.
- Centaba. 2020. Web sitesi: <https://centaba.com/product/wistar-rats-albino/>, Erişim tarihi: 23.09.2020
- Cleveland, C.B., Mayes, M.A. and Cryer, S.A. 2001. An ecological risk assessment for spinosad use on cotton. *Pest Manage. Sci.*, 58; 70-84.
- Çakıcı, Ö. ve Akat, E. 2013. Effects of Oral Exposure to Diazinon on Mice Liver and Kidney Tissues Biometric Analyses of Histopathologic Changes. *Analytical and quantitative cytology and histology*; 35(1); 7-16.
- El-Shenawy, N. S., El-Salmy, F., Al-Eisa, R. A. and El-Ahmary B. 2010. Amelioratory effect of vitamin E on organophosphorus insecticide diazinon-induced oxidative stress in mice liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96; 101-107
- Eren, B., Mercan, S. ve Dinç, N. 2017. Pestisit klorprifosun neden olduğu testis doku hasarı üzerine kurkuminin antioksidan etkisinin ışık mikroskopik olarak incelenme. *Anadolu Tarım Bilim. Derg. Anadolu J Agr Sci.* 32;139-146.
- Harkness, J.E., V. Turner, P., VandeWoude, S. and Colette L. 2010. *Wheler Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Wiley Blackwell, 5, 95-110.
- Kirst, H.A. 2010. The spinosyns family of insecticides: realizing the potential natural products research. *J Antibiot.* 63; 101-111.
- Özkaya, G., Çeliker, A. ve Koçer-Giray B. 2013. İnsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye'deki durumun değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg.*; 70(2); 75-102.
- PubChem. 2020. Web sitesi: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/comfortis_2, Erişim Tarihi: 23.09.2020

- Racke, K.D. 2007. A reduced risk insecticide for organic agriculture. Certified Organic and Biologically-Derived Pesticides: Environmental, Health, and Efficacy Assessment Symposium Series American Chemical Society., 92-108 p., Washington DC.
- Ramasubramanian, T. and Regupathy, A. 2004. Laboratory and field evaluation of spinosad against pyrethroid resistant population of *Helicoverpa armigera* hub. J. Biol. Sci., 4; 142-145.
- Ravikant, V., Lakshman, M., Madhuri, D., Kalakumar, B. 2018. Effect of spinosad and imidacloprid on histology of liver and kidney in male broilers and its amelioration with vitamin e and silymarin. The Pharma Innovation Journal, 7(4); 519-522.
- Sakai, Y., Tanaka, M. and Shirakawa, M. 2004. Lymphocyte changes in peripheral blood, spleen, and liver in DMBA-induced squamous cell carcinoma of mouse cheek skin. Odontology, 92; 36-42.
- Salgado, V.L. 1998 Studies on the mode of action of spinosad: Insect symptoms and physiological correlates. Pestic Biochem Phys., 60: 91-102.
- Schoonover, J.R. and Larson, L.L. 1995. Laboratory activity of spinosad on non-target beneficial arthropods, Arthropod Manage. Tests, 20; 357-358.
- Tao, H., Y. Zhang, Z. Deng, and T. Liu. 2019. Strategies for enhancing the yield of the potent insecticide spinosad in actinomycetes. Biotechnol J., 14;1700769.
- Tuğyan, K., Tuğyan, N., Erbil, G., ve Buldan, Z. 2005 Malathion'un böbrek üzerine etkilerinin ultrastrüktürel incelenmesi: Deneysel çalışma. Türkiye Ekopatoloji Dergisi. 11 (2); 51-57.
- Uzunhisarcıklı, M.ve Kalender, Y. 2011. Protective effects of vitamins C and E against hepatotoxicity induced by methyl parathion in rats. Ecotoxicology and Environmental Safety., 74(7):2112-2118
- Yano, B.L., Bond, D.M., Novilla. M.N., McFadden. L.G., Reasor, M.J. 2002. Spinosad insecticide: subchronic and chronic toxicity and lack of carcinogenicity in Fischer 344 rats. Toxicol. Sci., 65; 288-298.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burak TUNÇ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi: 15/08/1994

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Büyük Kolej (2012)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2017)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
(Ekim 2020)