SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANOFOSFAT METABOLİTLERİNİN İNSAN HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE NÖROTOKSİSİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burak DEMİRBAĞ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sermet SEZİGEN

Tıbbi KBRN Ana Bilim Dalı

Tıbbi KBRN Doktora Tezi

Haziran/2023

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Burak DEMİRBAĞ

20 Haziran 2023

ÖZET

Kimyasal harp maddesi olan sinir ajanları ile aynı fiziksel ve kimyasal yapıya sahip olan organofosforlu pestisitler halen tarımda yaygın olarak kullanılmakta ve her yıl binlerce insanın büyük oranda kazayla ve nispeten çok daha az oranda intihar amaçlı kullanımı nedeniyle hayatını yitirmesine sebep olmaktadır. 2000'li yıllara kadar sinir ajanları ile ilgili bilgilerimiz asetilkolin birikiminin neden olduğu semptomlarla sınırlıyken, son zamanlarda sinir ajanlarının neden olduğu oksidatif stres ve buna bağlı organ hasarı belirtileri hemen hemen tüm sistemlerde görüldüğü hakkında birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda paraokson molekülünün Kan Beyin Bariyeri (KBB) (BMVEC/ACBRI/Kırkland WA) ve Nöroblastoma (NB) (SH-SY5Y /CRL-2266, ATCC) hücre hatlarının canlılığı üzerindeki toksik etkileri, bu hücre hatlarında neden olduğu oksidatif hasar ve en sık kullanılan antioksidanlardan N-asetil sistein (NAC) molekülünün antioksidan etkinliği incelendi.

SH-SY5Y hücre hattında organofosfat metaboliti olan Paraokson Etil (PE) ve Paraokson Metil (PM) IC_{50} dozları 24 saatte 0,5 ve 0,6 milimolar (mM), 48 saatte 0,5 ve 0,72 mM ve BMVEC hücre hattında ise sırasıyla 24 saatte 0,66 ve 0,76 mM ve 48 saatte ise 0,5 ve 0,5 mM olarak ölçülmüştür. xCELLigence testlerinde SH-SY5Y hücre hatlarında PE maruziyetinde 33. saat, PM maruziyetinde 20. saatten sonra NAC'ın proliferatif etkisinin belirginleştiği ve BMVEC hücre hatlarında ise NAC'ın koruyucu etkisinin hemen gözlenmeye başladığı, bu etkinin PE ile 24 saatten ve PM ile 48 saatten sonra azalmaya başladığı gözlenmiştir. Oksidatif stres testlerinde BMVEC hücre hatlarında; PE ve PM'nin ilk 24 saatte T-GSH düzeylerini yükselttiği, GPx düzeylerini düşürdüğü ve NAC'ın bu etkileri ilk 24 saatte tersine çevirdiği, SH-SY5Y hücre hatlarında ise PE, PM ve NAC'ın T-GSH seviyelerine üzerine etkilerinin benzer olduğu ancak SH-SY5Y hücre hatlarında GPx seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Organofosfat zehirlenmesine bağlı kolinerjik semptomları takip eden nörolojik semptomların bir nedenin de artmış oksidatif stres olduğu değerlendirilmektedir. Bu nedenle oksidatif dengeyi; etkilenen kurbanlar lehine değiştirecek olan NAC molekülünün standart tedavi protokollerine eklenmesinin

sağlayacağı faydaya yönelik ileri seviye çalışmalara ihtiyaç olduğu değerlendirilmektedir.

Anahtar kelimeler: KBRN, Organofosfatlar, Kan Beyin Bariyeri, Paraokson, Oksidatif Stres, N-Asetil Sistein.

ABSTRACT

Organophosphorus pesticides, which have the same physical and chemical structure like nerve agents as a chemical warfare agent, are still widely used in agriculture and cause thousands of people to die every year, mostly due to accidental use and to a much lesser extent for suicidal use. Until the 2000's, our knowledge about nerve agents was limited with the symptoms due to the accumulation of acetylcholine but recent studies investigate nerve agent dependent oxidative stress and especially neurotoxicity almost in all systems. In our study, the effects of paraoxon molecule on the viability of blood-brain barrier (BBB) (BMVEC/ACBRI/Kırkland WA) and neuroblastoma (NB) (SH-SY5Y /CRL-2266, ATCC) cell lines, the oxidative damage in these cell lines, and the antioxidant activity of N acetyl cysteine (NAC) which is one of the most used antioxidants, were investigated.

Paraoxon Ethyl (PE) and Paraoxon Methyl (PM) are both organophosphate metabolites. Their IC_{50} doses in the SH-SY5Y cell line are 0.5 and 0.6 milimolar (mM) in 24 hours, 0.5 and 0.72 mM in 48 hours, and in BMVEC cell line 0.66 and 0.76 mM at 24 hours, and 0.5 and 0.5 mM at 48 hours, respectively. In xCELLigence tests, the proliferative effect of NAC became evident in SH-SY5Y cell lines after 33 hours of PE exposure and after 20 hours of PM exposure. It was observed that protective effect of NAC began immediately in BMVEC cell lines and this effect decreased after 24 hours in PE exposed cells and after 48 hours in PM exposed cells. In oxidative stress tests of BMVEC cell lines, it was found that PE and PM increased T-GSH levels in the first 24 hours, decreased GPx levels. NAC reversed these effects in the first 24 hours, whereas PE, PM, and NAC had similar effects on T-GSH levels in SH-SY5Y cell lines. However, no significant change was observed in GPx levels in SH-SY5Y cell lines.

Increased oxidative stress is one of the causes of neurological symptoms following cholinergic symptoms due to organophosphate poisoning. Therefore, it is evaluated that there is a need for advanced studies about the benefit of adding the

NAC molecule, which will change it in favor of the affected victims, to the standard treatment protocols.

Keywords: CBRN, Organophosphates, Blood Brain Barrier, Paraoxon, Oxidative Stress, N-acetyl Cysteine.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında her daim desteğini yanımda hissettiğim, bilim insanı disiplinini bana ve diğer öğrenci arkadaşlarıma öğreten, tez sürecinde benim için hafta sonlarından dahi feragat eden abim, danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sermet SEZİGEN'e sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım. Tez çalışmasının her aşamasında beni destekleyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Selçuk KILIÇ'a, varlıkları ile katkı sunan bölümümüzün öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Levent KENAR ve Sayın Doç. Dr. Mesut ORTATATLI'ya teşekkür ederim.

Hücre hatlarının hazırlanmasında sabırla beni destekleyen Sayın Meral SARPER'e, xCELLigence testleri sırasında tecrübelerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Özgür EŞİM'e ve oksidatif stres testleri sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Merve BACANLI'ya şükranlarımı sunarım.

Birlikte eğitime başladığımız arkadaşlarım Sayın Dr. Zahir KILIÇ ve Sayın Ayla Sayın ÖZTÜRK'e saygılarımı sunarım. Tezim için gerekli desteği sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirim.

Eğitime başlama ve derslere katılım konularında her zaman yanımda olan, sırasıyla görev yaptığım TSK Sağlık Komutanlığı ve 8'inci Ana Jet Üs Komutanlığındaki komutanlarım; Sayın Prof. Tbp. Tuğg. Ufuk DEMİRKILIÇ, Sayın Hv. Plt. Tümg. Ali ÖZMEN ve Sayın Hv. Plt. Tuğg. Gürtaç KAYAPINAR'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Bana merhametli, dürüst ve ahlaklı olmayı miras bırakarak çok genç yaşlarda ebediyete intikal eden sevgili anne ve babama özlemle sevgilerimi sunarım. Eğitimim süresince desteğini esirgemeyen sevgili kardeşim Burcu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, verdiği manevi destekle her daim yanımda olan hayat arkadaşım Tuğba ve aramızdaki mesafeye rağmen teknoloji desteği sağlayan oğlum Demir'e sevgilerimi sunarım.

Burak DEMİRBAĞ

Diyarbakır / 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xiii
RESİMLERİN LİSTESİ xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR xv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARI 5
2.2. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ TARİHÇESİ 5
2.3. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ ÖZELLİKLERİ 10
2.4. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ SINIFLANDIRILMASI 10
2.5. SİNİR AJANLARI 12
2.6. SİNİR AJANLARININ FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ 14
2.7. ASETİLKOLİN (ACh) 15
2.8. ASETİLKOLİN ESTERAZ (AChE) 17
2.9. SİNİR AJANI ZEHİRLENMESİNDE KLİNİK ve TEDAVİ 18
2.10. OKSİDATİF STRES 21
2.11. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI 22
2.12. SİNİR AJANLARI ve OKSİDATİF STRES 24
2.13. KAN BEYİN BARİYERİ HÜCRELERİ 25
2.14. NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ 26
2.15. PARAOKSON 26
2.16. N-ASETİL SİSTEİN (NAC) 28
3. GEREÇ ve YÖNTEM 31
3.1. KORUYUCU TEDBİRLER 31
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR ve EKİPMAN 31
3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER ve REAKTİFLER 31
3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARININ HAZIRLANMASI 32
3.4.1. HÜCRE HATLARININ ÇOĞALTILMASI 32

3.4.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI 32
3.5. PE ve PM'nin ÇÖZÜNECEĞİ ORGANİK SOLVENT ve SOLVENT KONSANTRASYONUNUN MTT YÖNTEMİ ile BELİRLENMESİ 33
3.6. MTT YÖNTEMİ.....34
3.7. PE, PM ve NAC STOK SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI 35
3.8. PE, PM ve NAC'ın BMVEC ve SH-SY5Y HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTELERİNİN MTT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ.....36
3.9. PE, PM ve NAC'ın IC_{50} DOZLARININ BMVEC ve SH-SY5Y HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ (xCELLigence DENEYİ) ile ÖLÇÜLMESİ 37
3.10. xCELLigence TESTLERİ İÇİN GRUPLARIN HAZIRLANMASI.....39
3.11. OKSİDATİF STRES TESTLERİ 40
3.11.1. GLUTAYON PEROKSİDAZ (GPx) ENZİM AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....40
3.11.2. TOTAL GLUTATYON (T-GSH) DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....42
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....44
4. BULGULAR..... 45
4.1. MTT TEST SONUÇLARI 45
4.1.1. ETANOL ve ASETONUN SİTOTOKSİSİTESİ.....45
4.1.2. PM ve PE'nin IC_{50} DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI 46
4.1.3. NAC'ın SİTOTOKSİSİTESİ.....46
4.2. xCELLigence TEST SONUÇLARI.....47
4.2.1. SH-SY5Y HÜCRE HATTI TESTLERİ.....47
4.2.1.1. SH-SY5Y/NAC.....47
4.2.1.2. SH-SY5Y/PE/NAC.....48
4.2.1.3. SH-SY5Y/PM/NAC 49
4.2.2. BMVEC HÜCRE HATTI TESTLERİ 49
4.2.2.1. BMVEC/NAC 49
4.2.2.2. BMVEC/PE/NAC.....50
4.2.2.3. BMVEC/PM/NAC.....51
4.3. OKSİDATİF STRES TEST SONUÇLARI 52

4.3.1. SH-SY5Y HÜCRE HATTI UYGULAMA SONUÇLARI.....52
4.3.2. BMVEC HÜCRE HATTI UYGULAMA SONUÇLARI.....55
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇLAR 71
7. KAYNAKLAR 73
8. EKLER..... 83
9. ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ..... 88

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1 Sinir Ajanlarının Genel Kimyasal Yapısı. 12
Şekil 2.2. Paration Metabolizması. 27
Şekil 2.3. N-Asetil Sisteinin Kimyasal Yapısı. 28
Şekil 4.1. SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. 48
Şekil 4.2. PE Uygulanmış SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. 48
Şekil 4.3. PM Uygulanmış SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. 49
Şekil 4.4. BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'in Etkisi. 50
Şekil 4.5. PE Uygulanmış BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. 51
Şekil 4.6. PM Uygulanmış BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. 51
Şekil 4.7. PE ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri..... 53
Şekil 4.8. PM ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. 53
Şekil 4.9. PE ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. 54
Şekil 4.10. PM ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. 54
Şekil 4.11. PE ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. 55
Şekil 4.12. PM ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri..... 56
Şekil 4.13. PE ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri 56
Şekil 4.14. PM ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. 57

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge 2.1. Kimyasal Savaş Ajanlarının Fizyolojik Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması. 11
Çizelge 2.2. DSÖ Rehberinde Tanımlanmış Tehlikelerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması. 12
Çizelge 2.3. Sinir Ajanlarının Temel Fizikokimyasal Özellikleri. 15
Çizelge 2.4. Peradeniya Organofosfor Zehirlenme Ölçeği 19
Çizelge 2.5. Sinir Ajanı Zehirlenmesinde Etkilenen Sistemlere Göre Belirti ve Bulgular. 19
Çizelge 2.6. Sinir Ajanı Maruziyet Şiddeti ve Maruziyet Yoluna Göre Belirti ve Bulgular 20
Çizelge 3.1. Etanol ve Aseton Konsantrasyonlarının Hesaplanması. 33
Çizelge 3.2. xCELLigence Testi İçin Gruplar 39
Çizelge 3.3. Test Kiti Bileşenleri. 41
Çizelge 3.4. Test Öncesi Hazırlık Aşamaları 41
Çizelge 3.5. Test Kiti Bileşenleri. 43
Çizelge 3.6. Test Öncesi Hazırlık Aşamaları. 43
Çizelge 4.1. Etanol ve Aseton Çözeltilerinin Çeşitli Konsantrasyonlarda SH-SY5Y ve BMVEC Hücre Hatlarında Sitotoksisitesi. 45
Çizelge 4.2. PE ve PM'nin IC_{50} Değerleri. 46
Çizelge 4.3. NAC'ın Sitotoksisitesi. 46
Çizelge 4.4. xCELLigence Testlerinin Planlaması. 47

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 2.1. Asetilkolinin asetilkolin esteraz enzimi ile yıkımı 16
Resim 2.2 Paraokson Maruziyeti Sonrası Sinaptik Olaylar 28
Resim 3.1. Uygulanacak Solvent Konsantrasyonunun Belirlenmesi Maksadıyla Kuyucukların Dizaynı. 34
Resim 3.2. Çok Kanallı Pipet ile Hücrelerin Ekimi. 36
Resim 3.3. MTT Testi Hazırlıkları. 36
Resim 3.4. MTT Test Süreci. 37
Resim 3.5. xCELLigence Cihazı 37
Resim 3.6. xCELLigence Sisteminde Empedans Ölçüm Prensibi 38
Resim 3.7. xCELLigence Testleri. 39
Resim 3.8. Oksidatif Stres Testleri. 40

SİMGELER ve KISALTMALAR

A-234 : Novichok
AC : Hidrojen Siyanid
ACh : Asetil kolin
AChE : Asetilkolin Esteraz
ATP : Adenozin Tri Fosfat
BChE : Butirilkolin esteraz
BMVEC : KBB HücreHattı
BZ : 3-Kuinüklidinil benzilat
CAT : Katalaz
CCL_4 : Karbon Tetra Klorür
CG : Fosgen
CK : Siyanojen klorür
CN : 2-Chloro-1-phenylethanone
CR : Dibenz (b,f)-1,4-oksazepin
CS : 2-Chlorobenzalmalononitrile
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
DP : Difosgen
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
FAO : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
Fe^{+2} : Demir Molekülü
GA : Tabun
GABA : Gama Amino Bütirik Asit
GB : Sarin
GD : Soman
GF : Siklosarin
GPx : Glutatyon Peroksidaz
GSH : Redükte Glutatyon
GSSG : Okside Glutatyon
GWI : Körfez Savaşı Hastalığı (Gulf War Illness)
H_2O_2 : Hidrojen Peroksit
HCN : Hidrojen siyanür
HD : Sülfür Mustard
HN : Nitrojen Mustard
İMS : İntermediate Sendrom
KBB : Kan Beyin Bariyeri Hücre Hattı
KBRN : Kimyasal, Biyolojik, Radyolojik ve Nükleer
KSA : Kimyasal Savaş Ajanı
KSYÖ : Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü

L	: Lewisit
LCt_{50}	: Üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan derişim ve gerekli maruz kalma süresi.
LD_{50}	: Üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan madde miktarı.
LSD	: Lysergic Acid Diethylamide
M	: Molar
MDA	: Malonil Dialdehit
NAC	: N-Asetil Sistein
NB	: Nöroblastoma Hücre Hattı
NTE	: Nöropati Hedef Esteraz
O_2	: Oksijen Molekülü
$O_2^{\cdot}$-	: Süperoksit
$OH^{\cdot}$	: Hidroksil Radikali
OP	: Organofosfor
OPCW	: Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü
OPIDN	: OP ile İndüklenen Gecikmiş Nöropati
PE	: Paraokson Etil
PM	: Paraokson Metil
PS	: Klorpikrin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SH-SY5Y	: NB Hücre Hattı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TEPP	: Tetraetil pirofosfat
T-GSH	: Total Glutatyon
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa
VR	: Russian VX
VX	: O-Ethyl-S-(2-diisopropylamino-ethyl)-methylphospono fluoridate

1. GİRİŞ

Organofosforlu bileşiklerin tarihsel gelişimine baktığımızda; başlangıçtaki üretim amacının tarım zararlılarından kurtulup ürün miktarını arttırmak olduğu gözümüze çarpmaktadır. Bu bileşiklerin üretimi günümüzden 170 yıl öncesine kadar gitmektedir. Literatürde ilk sentez edilen organofosforlu bileşik olan tetraetil pirofosfat'ın (TEPP) sentezinin 1850'li yıllara dayandığı görülmektedir. Zaman içerisinde bu bileşiklerin insan sağlığı üzerine son derece olumsuz etkilerinin gözlenmesiyle birlikte bir yandan pestisit üretimi sürerken, diğer yandan savaşlarda üstünlük sağlamak amacıyla da potansiyel bir silah olarak pestisit geliştirme çabalarının sürat kazandığını, günümüzde ise üretim ve depolanmalarına karşı getirilen ciddi yasaklamalar nedeniyle daha çok terör olayları ve suikast amaçlı kullanımları ile gündeme gelseler de, tarım ilaçlarıyla intihar dışında kazayla maruziyetlere bağlı vefat sayılarının çok ciddi boyutlara ulaştığını görmekteyiz.

Pestisitlere maruziyet sonrası pek çok akut etki görülebilmektedir. Söz konusu etkiler maruz kalınan bileşiğe ve dozuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Pestisitlere bağlı intoksikasyon tablolarının yanlışlıkla alıma bağlı veya yoğun tarım yapılan ülkelerde mesleki maruziyetler nedeniyle ölümlere sebep olduğu bildirilmektedir. Bahse konu intoksikasyonların ana sebebinin pestisitlere ulaşımın kolay olması ve kullanımları ile ilgili denetlenebilirliğinin olmaması şeklinde belirtilmektedir. Pestisit rezidülerinin yarattığı çevresel kirlenme ise kronik toksisite için önemli bir husus olarak göze çarpmaktadır (1).

Organofosforlu pestisitler günümüzde en sık kullanımı olan ve en fazla zehirlenme vakasına yol açan pestisit grubudur. Organofosfat bileşikleri, en yaygın kullanılan pestisit gruplarından biridir ve giderek organoklorinlerin (DDT, aldrin, lindan vb.) yerini almıştır. Organofosforlu pestisitler doğada daha hızlı degrade oldukarından, organoklorlu bileşikler yerini almışlardır. Dolayısıyla organofosforlu pestisitler, biyolojik bozunmaya dirençli oldukları bilinen ve lipitleri bağlama kapasiteleri nedeniyle biyolojik olarak birikebilen ve bu nedenle besin zinciri boyunca yeniden dağıtılabilen organoklorlu bileşiklere göre nispeten daha düşük

çevresel kalıcılığa sahip oldukları için tarımsal uygulamalarda tercih edilmektedir (1-3).

Pestisitlere bağlı ölümlerin yarıdan fazlası organofosforlu bileşiklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (2).

Kazayla maruziyetlere ilişkin Boedeker ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, 2006 ve 2018 yılları arasında yayınlanan literatürün sistematik bir incelemesi yapılarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nden alınan ölüm verileriyle birleştirilmiş ve pestisitlere bağlı yıllık 385 milyon kaza ile zehirlenme vakası ve 11 bin vefat olduğu bildirilerek, kazayla pestisit maruziyetinin önemine dikkat çekilmiştir (3).

Konu ile ilgili olarak Robb ve arkadaşları tarafından; dünya çapında tahminen 3 milyon ve üzerinde insanın her yıl organofosforlu bileşiklere maruz kaldığı ve bu durumun yaklaşık 300.000 ölüme neden olduğu bildirilmektedir (4).

Bahse konu maruziyetlerin uzun dönem sonuçlarına ilişkin yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte, akut, subakut ve kronik zehirlenme bulguları yanı sıra arka planda oksidatif strese bağlı organ ve sistem tahribatı da meydana gelmektedir.

Bizlere bu noktada büyük sorumluluk düşmektedir. Oksidatif hasara bağlı bulguları ve bununla baş edecek yöntemleri ortaya koyarak organofosforlu bileşiklere maruz kalan insanların sağlıklarına yeniden kavuşmalarını sağlayabiliriz.

Bunun dışında tükettiğimiz gıdalardaki pestisit rezidüleri nedeniyle yaşantımız boyunca ne kadar pestisite maruz kaldığımız ve bu durumun vücudumuzda yarattığı tahribat konusu oldukça düşündürücüdür. Zira konuyla ilgili birçok yasal düzenleme yapılmış olmasına rağmen konunun takibi noktasında bazı boşluklar bulunmaktadır. Örneğin marketlerde satılan meyve ve sebzeler ilgili market tarafından denetlenmekte iken, şehirler arası bir seyahat sırasında yolumuza çıkan bir üreticiden aldığımız ve organik olduğu iddia edilen köy ürünlerinin ne kadar güvenli olduğu gerçekten büyük bir soru işaretine sebep olmaktadır.

Bu maksatla Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) iş birliğiyle "Pestisit Yönetimine ilişkin Uluslararası Davranış Kuralları" geliştirilmiş ve devletlere, özel sektöre, sivil toplum ile diğer paydaşlara, üretimden imhaya kadar yaşam döngüleri boyunca pestisitlerin yönetiminde iyi uygulamalar konusunda rehberlik etmektedir (5).

Maruziyet yollarına kısaca değinilen organofosforlu bileşiklerle ilgili olarak tez konusu olan çalışmada bu bileşikler nedeniyle ortaya çıkan nörotoksisite, oksidatif hasar ve korunmada N asetil sistein (NAC) molekülünün etkinliğini incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARI

Konuyla ilgili bilim insanları arasında "fakir ülkelerin atom bombası" mottosuyla anılan Kimyasal Savaş Ajanları'nın (KSA) türüne göre etki gücü değişmekle birlikte fizyolojik etkileriyle hedef kitleleri öldürme veya ağır yaralanma sonucu görev yapamaz hale getirme özellikleri yanı sıra yarattığı korku nedeniyle karşı tarafı koruyucu teçhizat kuşanarak hareket kabiliyetini sınırlama amacıyla kullanılmaktadırlar.

2.2. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ TARİHÇESİ

KSA'nın kullanımına dair bulgular antik çağlara kadar uzanmakta, insanoğlunun tarih boyunca savaşlarda hasımları karşısında üstünlük sağlamak amacıyla çeşitli zehirlerden istifade ettikleri görülmektedir.

İlk kez Mısır firavunu Menes'in M.Ö.3000'li yıllarda bitki ve hayvanlardan zehirler ürettiği ayrıca Mısırlılar'ın hidrosiyanik asitin ölümcül etkilerini keşfettikleri, M.Ö.2000'li yılların başlarında savaşlarda sedatize edici dumanlar kullandıkları ve M.Ö.1000'li yıllara ait Çin yazıtlarında ise zehirli dumanların savaşta kullanımı maksadıyla çeşitli formüllere sahip oldukları uygarlıklar tarihine ait kayıtlarda yer almaktadır (6).

Kimyasal ajanların kullanımına ait bilgi ve verileri kronolojik olarak özetlemek gerekirse;

M.Ö. 600'lü yıllarda Atina'lı diktatör Solon tarafından Bohçaotu (Helleborus) bitkisinin kökleri Kirrha şehrinin kuşatılması sırasında şehrin su kaynaklarını kontamine etmek maksadıyla kullanılmıştır (6).

M.Ö. 428 yılında Spartalılar tarafından Pellepones savaşı sırasında zift ve kükürde bulanan odunlar Platea şehrinin duvarları önünde yakılarak boğucu arsenik dumanı oluşturulması amaçlanmış ancak şiddetli yağmur bu planın tam olarak

gerçekleşmesine fırsat vermese de halk üzerinde büyük ölçüde paniğe yol açmıştır(6).

M.Ö. 424 yılında aynı strateji yine Spartalılar tarafından bu kez Delium şehri kuşatmasında kullanılmıştır (6).

M.Ö. 200'lü yıllarda Kartacalılar düşmanlarının şaraplarına adam otu bitkisinin köklerini atarak, onları sedatize etmişlerdir (6).

M.Ö.82-72 yılları arasında Romalılar tarafından inhale edildiğinde körlük ve boğucu pulmoner semptomlara yol açan fosgene benzer zehirli duman kullanmıştır (6).

M.S. 1456 Belgrad şehrinin savunmasında Arsenik dumanı kullanılmıştır. Bu durum Avusturyalı yazar Von Senfftenberg tarafından "Üzücü bir işti. Hristiyanlar diğer Hristiyanlara karşı asla bu kadar öldürücü bir silah kullanmamalıdır. Yine de Türklere ve benzeri zalimlere karşı kullanılabilir." şeklinde tarif edilmiştir (7).

1675'te Fransızlar ve Almanlar, zehirli mermi kullanımını yasaklayan ilk uluslararası anlaşma olan Strazburg Anlaşması'nı imzaladılar(8).

1899 İngilizler Boer Savaşı sırasında top mermilerinde pikrik asit kullanmıştır(8).

1899'daki Birinci Lahey Barış Konferansı'nda zehir veya zehirli silahların kullanımı yasaklanmış ve Amerika Birleşik Devletleri tarafından onaylanmıştır. Ancak mermilerdeki boğucu gazları yasaklayan ayrı bir bildirge, Avrupa'nın önde gelen güçlerinin tümü tarafından imzalanmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri tarafından reddedilmiştir (8).

Kimyasal savaş ajanlarının oyun değiştirici rolü aslında en çok Birinci Dünya Savaşı sırasında gözümüze çarpmaktadır. Birinci Dünya Savaşı sırasında kullanılan ajanları kronolojik olarak sıralamak gerekirse;

1914'te Fransızlar tarafından etilbromoasetat ve kloroaseton, Almanlar tarafından o-diasinidin klorosülfonat kullanılmıştır (9-10).

1915’te Almanlar tarafından Ypres şehri saldırısı sırasında klorin kullanılmıştır (8,10).

1916’da Fransızlar tarafından hidrojen siyanür ve siyanojen klorür kullanılmıştır (9,11).

1917’de Almanlar tarafından difenil kloroarsin ve yine Ypres şehrinde sülfür mustard kullanılmıştır (9,11).

1918’de Almanlar tarafından etil ve metil dikloroarsin kullanılmıştır (9,11).

Birinci Dünya Savaşı'nın sona ermesinin ardından, birçok ülke kimyasal savaşı yasaklamaya çalıştı. 1925'te dünyanın önde gelen 16 ülkesi, bir daha asla savaşta gaz kullanmama sözü veren Cenevre protokolünü imzalamıştır. Amerika Birleşik Devletleri anlaşmayı imzalamış ancak ABD Senatosu anlaşmayı onaylamayı reddetmiştir. 1975 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri protokolü onaylamamış fakat Cenevre protokolüne rağmen, kimyasal silah kullanımı olayları devam etmiştir (8). Bu açıdan özellikle Cenevre protokolünü imzalamış olmalarına rağmen İtalyanlar tarafından Kızılhaç’a ait ambulanslar, hastaneler ve sivil hedefler bombalanarak ciddi ihlaller gerçekleştirildiği bilinmektedir (10).

Birinci Dünya savaşından günümüze dek KSA’nın kullanımıyla ilgili olarak;

1936’da İtalyanlar Etiyopya’ya karşı klorasetofenon ve sülfür mustard kullanmıştır (8,11).

1937-1945 yıllarında Japonya’nın Çin istilası sırasında klorasetofenon, difenil siyanoarsin, fosgen, sülfür mustard ve lewisit gazları kullanılmıştır (8,11).

1940-1945 yılları arasında Alman toplama kamplarında hidrojen siyanürün toza emdirilmesiyle hazırlanan Zyklon-B gazı kullanılmıştır (9,11).

1963-1967 yılları arasında Mısırlılarla Yemen arasındaki çatışmalarda klorasetofenon ve sülfür mustard kullanılmıştır (8,11).

1961–1970 yılları arasında ABD'nin Güney Vietnam müdahalesi sırasında ABD tarafından 2-klorobenzalmalononitril (CS) ve Güney Vietnam tarafından klorasetofenon ve adamsit kullanılmıştır. Ayrıca ABD tarafından çeşitli miktarlarda n-butil 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), n-butil 2,4,5-triklorofenoksiasetat (2,4,5-T), izo-bütil triklorofenoksiasetat, kakodilik asit veya pikloram karışımı içeren ajan mor, turuncu, beyaz ve mavi isimleri ile anılan defoliyasyona yol açan kimyasallar kullanılmıştır (9).

1983–1988 yılları arasında Irak-İran savaşı sırasında Irak tarafından sülfür mustard, tabun ve sarin kullanılmıştır (8,10,11,13).

3 Aralık 1984'te meydana gelen Bhopal felaketi, tarihin en kötü endüstriyel kazası olarak adlandırılmaktadır. Yaklaşık 45 ton metil izosiyanat gazı, Amerikan firması Union Carbide Corporation'ın Hindistan'daki yan kuruluşuna ait bir pestisit tesisinden çevreye salınmış, binlerce insanı anında ölümüne sebep olmuştur (12).

1987–1988 Halepçe'de Irak tarafından sülfür mustard ve sarin kullanılmıştır (6,9).

1990'ların başlarında Soğuk Savaşın bitmesiyle birlikte Sovyetler Birliği Novichok adıyla anılan kimyasal ajanları geliştirmiştir. Sovyet Vil Mirzayanov Sovyet Foliant Programını ve Novichok serisi A-230, A-232, A-234, A-240 ve A-262 bileşiklerin kimyasal yapılarını açığa çıkarmıştır (13).

1994 yılında Matsumoto'da Aum Shinrikyo terörist saldırısı sırasında Sarin kullanılmıştır (14).

1995 yılında Tokyo'da Aum Shinrikyo terörist saldırısı sırasında Sarin kullanılmıştır (14).

29 Nisan 1997 tarihinde, kimyasal silahların üretimini, depolanmasını ve kullanımı yasaklayan Kimyasal Silahlar Sözleşmesi yürürlüğe girmiştir. Bahse konu sözleşme hükümleri Kimyasal Silahları Yasaklama Örgütü (KSYÖ) tarafından yürütülmekte olup imza atan 193 devlet bulunmaktadır.

2004 yılı Ekim ayında intoksikasyona bağlı olarak Viyana'da tedavi altına alınan Ukrayna Devlet Başkanı Victor Yushchenko'dan alınan vücut örnekleriyle yapılan detaylı analizlerde dioksin ile zehirlendiği açıklanmıştır (15).

2012-2018 yılları arasında Suriye'de rejim güçleri tarafından sarin ve sülfür mustard gazları kullanılmıştır (11).

2013 yılında Hindistan'da 23 öğrenci, okulda öğle yemeğini yedikten sonra vefat ettiler. Ardından yapılan incelemelerde yemekleri hazırlamak için kullanılan yağın konulduğu kapta daha önce pestisit (monokrotofos) konulması nedeniyle yağın kontamine olduğu bildirilmiştir (16).

13 Şubat 2017'de eski Kuzey Kore lideri Kim Jong-Il'nin en büyük oğlu olan Kim Jong-Nam, Malezya'daki Kuala Lumpur havaalanında aniden ölmüş, havaalanı kameralarından elde edilen görüntülerde, önce Endonezyalı bir kadının Kim'in yüzüne temas ettiği ve ardından Vietnamlı bir kadının Kim'in yüzüne temas ettiği tespit edilmiştir. Bu olayla ilgili olarak Malezya hükümeti tarafından yapılan kimyasal analiz, Kim'in VX ile öldürüldüğünü göstermiştir (17).

4 Mart 2018'de İngiltere'nin Salisbury kentindeki bir parkta çifte ajan olduğu iddia edilen Sergei Skripal ve kızı Yulia Skripal baygın halde bulunmuş ve günlerce bilinçleri kapalı olarak takip edilmişlerdir. Bilinç kaybının birincil nedeni uzun süre tespit edilememiştir. İlerleyen günlerde Birleşik Krallık makamları, Skripal ve kızının "Novichok (A-234)" isimli sinir ajanına maruz kaldıklarını açıklamıştır. Son olarak 12 Nisan 2018'de KSYÖ ajanın cinsini doğrulamıştır (18).

30 Haziran 2018'de Amesbury'de, Charlie Rowley ve Dawn Sturgess bilinç kaybı nedeniyle Salisbury Bölge Hastanesine kaldırılmış, ilerleyen süreçte polis tarafından yaklaşık dört ay önce 13 km uzaklıktaki Salisbury'de Sergei ve Yulia Skripal'in zehirlenmesinde kullanılan ajan ile aynı türden bir Novichok sinir ajanı tarafından zehirlendiklerini bildirilmiştir. Sturgess 8 Temmuz'da hayatını kaybederken, Rowley iki gün sonra iyileşme belirtileri göstermeye başlamıştır (19).

20 Ağustos 2020'de Moskova'ya gitmek üzere uçağa binen Aleksey Navalny'nin uçuş sırasında zehirlenme belirtileri göstermesi üzerine uçak acil iniş

yapmış, Omsk şehrindeki bir hastaneye götürülen Navalny'nin içtiği çaya konulan bir toksinle zehirlendiğinin belirlenmesi üzerine Navalny, tedavi için Berlin'deki Charite Hastanesine nakledilmiştir. Alman Hükümeti, 2 Eylül'de, Navalny'nin Novichok ile zehirlendiğinin kati olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Charite Hastanesi, beş gün sonra, Navalny'nin sağlık durumunun stabilleşmeye başladığını bildirmiştir (20).

2.3. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ ÖZELLİKLERİ

Kimyasal silah kullanımı ve seçimi aşamasında seçilecek ajanın kalıcılık özelliği (persistans), ortalama öldürücü doz (LD_{50}) değeri, meteorolojik şartlar ve arazi yapısının da mutlaka göz önünde bulundurulması gerekmektedir. İdeal bir KSA;

* Toksisitesi yüksek, renksiz, kokusuz ve havadan ağır olması bir kimyasal maddede arzu edilen en önemli özelliklerdir.

* Su, hava ve diğer dış faktörlere karşı dayanıklı olmalıdır.

* Koruyucu maskeler tarafından kolaylıkla tutulması gerekir.

* Üretimi ve depolanması kolay ve ucuz olmalıdır (21).

2.4. KİMYASAL SAVAŞ AJANLARININ SINIFLANDIRILMASI

Kimyasal savaş ajanlarını fiziksel ve kimyasal özellikleri yanı sıra, kronolojik geliştirilme sıralarına, kullanım amaçlarına, toksik etkilerine veya hedef organ/sistem tutulumlarına göre sınıflandırmak mümkündür.

Günümüzde en çok fizyolojik etki mekanizmaları üzerinden yapılan sınıflandırma kabul görmekte ve anlatım kolaylığı da sağladığından yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1’de kimyasal savaş ajanları fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırması yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Kimyasal Savaş Ajanlarının Fizyolojik Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması.

Grup	Kimyasal Ajan	Kimyasal Adı	Sembol
Sinir Ajanları	Tabun	Ethyl-N,N-dimethyl phosporamidocyanidate	GA
	Sarin	Isopropyl methyl phosponofluoridate	GB
	Soman	Pinacolyl methyl phosponofluoridate	GD
	Siklosarin	Cyclohexyl methyl phosponofluoridate	GF
	VX	o-Ethyl-S-(2-diisopropylamino-ethyl)-methylphospono fluoridate	VX
	Russian VX	N,N-diethyl-2-(methyl-(2methylpropoxy)phosphoryl) sulfanylethanamine	VR
Yakıcı Ajanlar	Sülfür Mustard	Bis(2-chloroethyl)sulfide	HD
	Nitrojen Mustard	Tris(2-chloroethyl)amine	HN-3
	Lewisit	2-Chlorovinyl dichloroarsine	L
Akciğer İrritanları	Fosgen	Carbonyl chloride	CG
	Difosgen	Trichloromethyl chloroformate	DP
	Klor	Chlorine	CL
	Klorpikrin	Chloropicrin	PS
Sistemik Zehirler	Hidrojen Siyanür	Hydrocyanic acid, Formonitrile	AC
	Siyanojen Klorür	Chlorocyanide, Chlorine Cyanide	CK
Kapasite Bozucu Ajanlar	QNB	3-Quinuclidinyl benzilate	BZ
	LSD	Lysergic Acid Diethylamide	LSD
Kargaşa Kontrol Ajanları	Kloroasetofenon	2-Chloro-1-phenylethanone	CN
	Alonitril	2-Chlorobenzalmalononitrile	CS
	Lacrimotor	Dibenz (b,f)-1,4-oksazepin	CR

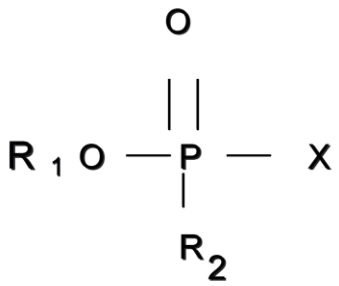
Bunların dışında DSÖ tarafından son olarak 2019 yılında güncellenen ve pestisitleri tehlikeleri açısından sınıflandıran rehbere göre pestisitler 5 gruba ayrılmaktadır (22). (Çizelge 2.2.)

Çizelge 2.2. DSÖ Rehberinde Tanımlanmış Tehlikelerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması.

Sınıf		Rat İçin LD_{50} Değeri (mg/kg vücut ağırlığı)	
		Oral	Dermal
Ia	Son Derece Tehlikeli	<5	<50
Ib	Yüksek Derecede Tehlikeli	5-50	50-200
II	Orta Derecede tehlikeli	50-2000	200-2000
III	Düşük Derecede Tehlikeli	>2000	>2000
U	Akut Tehlike Oluşturma Olasılığı Düşük	≥5000	

2.5. SİNİR AJANLARI

Sinir ajanları, fosforik asit esterleridir. Genel kimyasal yapıları Şekil 2.1.'de görülmektedir. R1, R2 ve X yerindeki grupların özelliğine göre değişik etkileri ortaya çıkmakla birlikte, yüksek toksisite X yerindeki grubun güçlü bir elektronegativiteye sahip oluşuna göre ortaya çıkmaktadır.(21)



Şekil 2.1 Sinir Ajanlarının Genel Kimyasal Yapısı.

Temel olarak Tabun, Sarin, Soman, Siklosarin ve VX olmak üzere beş organofosforlu bileşik sinir ajanları olarak anılmaktadır.

Yapısal olarak organofosforlu bileşikler fosforik asit, fosfonik asit ve fosfinik asitin ester, tiyol ve amid türevleridir. Tarımda onlarca farklı çeşidi kullanılmaktadır.

İçlerinde en fazla tercih edilenleri ise paration, klorpirifos, diklofention ve malation'dur (1).

Tarihsel olarak sinir ajanlarının kasıtlı ilk kullanımı, Afrika yerlileri tarafından Kalabar fasulyesinin büyücülerin cezalandırılması maksadıyla kullanılmasıdır (23).

Modern çağda ise ilk organofosforlu kolinesteraz inhibitörü olan TEPP'ın orijinal laboratuvar sentezi, Charles-Adolphe Wurtz'un, öğrencisi Wladimir Petrovich Moshnin tarafından gerçekleştirilmiştir. Prosedür, Wurtz'un başka bir öğrencisi olan Philippe de Clermont tarafından tekrarlanmış ve Fransız Bilimler Akademisi'ne bildirilmiştir. TEPP, yalnızca ilk organofosforlu kolinesteraz inhibitörü olarak değil, aynı zamanda çok sayıda isim altında ticareti yapılan en başarılı ticari ürün olarak tarihe geçmiştir (24).

Ardından 1930'larda Almanya'da IG Farben için çalışan ve başkanlığını Gerhard Schrader'in yaptığı bir araştırma ekibi, yerli gıda üretimini artırmak ve ithal gıdaya olan bağımlılığı azaltmak için yeni insektisitler geliştirmeyi amaçlayan çalışmalara başlamış ve 1936'da tabun sentezini gerçekleştirmişlerdir (25). Sonrasında Michaelis, Arbusow ve Nylen organofosforlu bileşiklerin kimyasında ilerleme sağlasalar da; çalıştıkları bileşiklerin toksisitesinin farkında olmamışlardır (26).

Yaklaşık bir yıl sonra Schrader ve ekibi ikinci defa yine organofosforlu bir bileşik olan sarini sentezlemişlerdir (26).

Alman hükümeti tarafından 1943 yılında tabun ve sarinin etki mekanizmalarının ortaya konulması maksadıyla Nobel ödüllü kimyager Richard Kuhn görevlendirilmiştir. Kuhn ve ekibi bu bileşiklerin asetilkolin esteraz enzimi inaktivasyonu ile asetilkolin akümülasyonuna sebep olarak santral ve periferik sinir sistemi üzerinde etkili olduklarını bulmuş ve sarinden daha potent bir sinir ajanı olan somanı sentezlemişlerdir (25).

1950'lere gelindiğinde yeni bir pestisit geliştirilmesi arayışıyla yürütülen çalışmalar esnasında İngiliz bilim adamı Ranajit Ghosh tarafından VX sentezlenmiş,

ancak bileşiğin çok letal olduğunun fark edilmesiyle birlikte ileri araştırmalar Porton Down'daki Kimyasal ve Biyolojik Silahlar Tesisi'nde yürütülmüştür (25).

1970'li yıllardan itibaren Sovyetler Sosyalist Cumhuriyetler Birliği tarafından Novichok olarak adlandırılan yeni nesil bir sinir ajanı geliştirilmiştir. A serisi olarak da adlandırılan bu nörotoksik bileşik; G ve V serisi ajanların türevi olarak geliştirilmiş olup toksisitesi VX ve somana nazaran çok daha yüksektir (28).

2.6. SİNİR AJANLARININ FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Saf halde olmayanların renkleri sarıdan kahverengiye değişen tonlarda olsalar da tüm sinir ajanları renksiz ve kokusuz sıvılardır. Ancak bu bileşikler fiziksel özellikleri açısından farklılıklar taşımaktadır. Örneğin V ajanlarının volatiliteleri G ajanlarına göre daha düşüktür (27).

Tabun, sarin ve soman'ın uçuculuk özellikleri daha fazla iken, dış ortamlara daha dayanıklı olan kalınlaştırılmış soman ve VX çevrede çok daha uzun süreler boyunca bozunmadan kalabilir. Bu özelliği ile VX ileri kontaminasyonlara sebebiyet verebilir. Bu nedenlerle, G-serisi ajanlar öncelikle solunum; V-serisi ajanları ise daha çok ciltten emilerek etki etmek üzere tasarlanmıştır. V-serisi ajanlar gerek solunum ve gerekse dolaşım sistemindeki hüreler yanı sıra konjuktivadan bile emilebilirler. Emilim en süratli ve hemen hemen tamamen solunum sistemi yoluyla olmaktadır. V-serisi ajanları aerosol şeklinde kullanıldıklarında yarı-geçirgen kişisel koruyucu elbiselerden de geçebilme özelliğine sahiptir (28).

Sinir ajanlarının temel fizikokimyasal özellikleri çizelge 2.3.'de yer almaktadır.

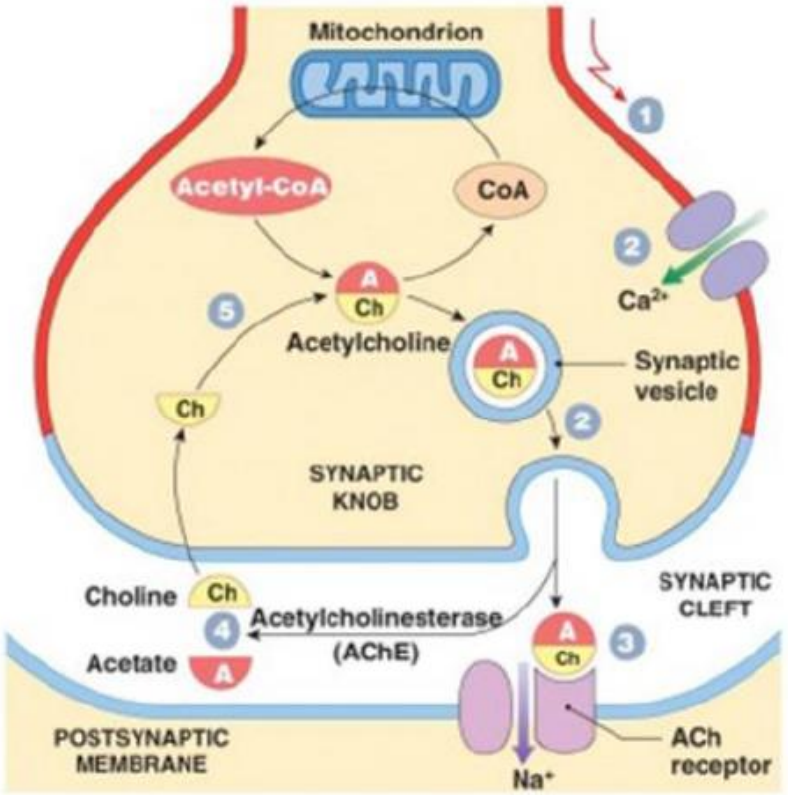
Çizelge 2.3. Sinir Ajanlarının Temel Fizikokimyasal Özellikleri.

Özellik	Sinir Ajanı				
	Tabun	**Sarin**	**Soman**	**VX**	**Siklosarin**
Kimyasal Adı	Ethyl-N, N-dimethyl phosporamidocyanidate	Isopropyl methyl phosponofluoridate	Ethyl-N, N-dimethyl phosporamidocyanidate	O-Ethyl-S-(2-diisopro pylamino-ethyl)-methyl phosponofluoridate	Cyclohexyl methyl phosponofluoridate
Molekül Ağırlığı (Da)	162,3	140,1	182,18	267,36	180,14
Erime Noktası (^{0}C)	-49	-56	-80	-20	-12
Kaynama Noktası (^{0}C)	246	147	167	300	-
25^{0}C'de Buhar Basıncı (mmHg) ve Volatilitesi (mg m^{-3})	0,07 / 611,3	2,9 / 21862	0,4 / 3921,4	0,0007 / 10,07	0,068 / 659

2.7. ASETİLKOLİN (ACh)

Henry Hallet Dale tarafından 1914 yılında keşfedilen asetilkolin ilk nörotransmitter olma özelliği ile birlikte, keşfi Dale'e fizyoloji/tıp alanında Nobel ödülü kazandırmıştır (25).

Asetilkolin presinaptik aksonların sitoplazmasında, enzimatik olarak asetil-koA ve kolin moleküllerinden sentezlenir ve her biri yaklaşık on bin asetilkolin molekülü içeren veziküllerde depolanır. Ekzositoz ile salındıktan sonra difüzyon aracılığıyla postsinaptik membrandaki reseptörlerine giderek etki gösterirler. Asetilkolinin sinaptik yarıklarda hidroliz ile inaktivasyonu sonucu asetat ve kolin oluşur. Bu reaksiyon asetilkolin salınımından birkaç milisaniye sonra asetilkolin esteraz enzimi ile katalize edilir (Resim 2.1.). Oluşan kolin tekrar presinaptik nörona geri alınarak asetilkolin sentezinde kullanılır (29).



Resim 2.1. Asetilkolinin asetilkolin esteraz enzimi ile yıkımı (30).

Asetilkolin kuarterner yapıda bir amonyum bileşiğidir ve hücre zarından geçemez. Parasempatik ve kolinerjik sinirlerde nörotransmitter olduğu halde çok hızlı parçalandığından tedavide kullanılamaz. Hem muskarinik hem de nikotinik etkileri bulunmaktadır. Asetilkolin etkileri şunlardır:

* Sinaptik düğümden çıkan uyarı sayısını azaltarak kalbin dakikadaki atım hızı ve atım hacminde azalmaya neden olur.

* Vazodilatasyon yaparak kan basıncını düşürür.

* Gastrointestinal sistemde tükürük salınımı, intestinal sekresyonların salınımını ve intestinal motiliteyi arttırır.

* Bronş sekresyonlarını arttırır.

* Genitoürüner sistemde detrüssor kas tonusunu arttırır.

* Gözde siliyer kasların kasılması ile akomodasyonu ve pupiller sfinkter kasların kasılması ile miyozisi sağlar (31).

2.8. ASETİLKOLİN ESTERAZ (AChE)

Asetilkolin esteraz; serin hidrolazlar grubundan olup, serin hidrolaz süper ailesi, substratların hidrolizi için kullanılan bir aktif bölge olan serininin varlığı ile karakterizedir ve insanlarda 200'den fazla enzimden oluşmaktadır (32).

Memelilerde, ilgili iki serin hidrolaz kolin ester konjugatlarının hidrolizini katalize eder. Asetilkolinesteraz, asetilkoline spesifik bir enzim olup esasen daha uzun zincirli kolin esterleri üzerinde hiçbir aktivitesi yoktur. Psödokolinesteraz, spesifik olmayan kolinesteraz veya serum kolinesteraz olarak da adlandırılan butirilkolinesteraz (BChE), diğer kolin ve kolin olmayan konjugatlara ek olarak asetilkolini hidrolize edebilir. Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz, memeli fizyolojisi ve davranışında, her iki enzimi de seçici olarak bozan yöntemlerle farklı rollere sahiptirler (32).

Asetilkolinesteraz insanlar ve omurgalılar dahil olmak üzere birçok canlı organizmadaki en önemli enzimlerden biridir, sinir sistemi ve kaslarda bulunur (33). Asetilkolinesteraz, hem hücre içi hem de hücre dışı asetilkolin metabolizmasına izin veren kan ve nöral sinapsların sitoplazmasına ve dış hücre zarına lokalizedir (34).

Organofosfatlar, asetilkolinesteraza bağlandıktan sonra hidrolize olan ve asetilkolinesterazın geri dönüşümsüz inaktivasyonu ile sonuçlanan asetilkolinesteraz aktif bölgesinin fosforilasyonuna yol açan bir grup fosforik asit ester bileşikleridir. Bu kovalent bağlı enzim-fosforilasyon kompleksi oldukça kararlıdır Ek olarak, bazı organofosfat bileşikleri yaşlanma (aging) adı verilen bir süreçten geçer. Bu işlem, organofosfat ve asetilkolinesteraz arasındaki kovalent bağın daha da güçlendirilmesiyle sonuçlanan oksijen-fosfor bağlarından birinin kırılmasını içerir. Örneğin, sinir ajanlarından soman 10 dakika içinde yaşlanırken, VX'in yaşlanması için en az 48 saat gereklidir (34).

Organofosfatlar hem pestisit (örneğin malation) hem de kimyasal savaş ajanları (örneğin VX, sarin, soman ve tabun) olarak kullanılmıştır. Organofosfat bazlı pestisitler her yıl dünya çapında, özellikle gelişmekte olan ülkelerin kırsal alanlarında yaklaşık 200.000 insanın hayatını yitirmesine sebep olmaktadır (35).

2.9. SİNİR AJANI ZEHİRLENMESİNDE KLİNİK ve TEDAVİ

Sinir ajanı zehirlenmelerinde klinik konusuna girmeden önce değinilmesi gereken bir husus ise toksisite oluşumu etkileyen faktörler konusudur. Buna göre toksisitenin ortaya çıkabilmesi için sac ayağını oluşturan 3 temel bileşen vardır. Bunlardan ilki; temas yolu dediğimiz toksinin vücuda hangi yolla alındığıdır. Toksik maddeler vücuda oral, solunum yolu, ciltten emilerek veya parenteral yoldan alınabilir. İkinci konu ise temas süre ve sıklığıdır. Bu durumda akut, subakut, subkronik ve kronik zehirlenmeler karşımıza çıkmaktadır. Son husus ise dozdur. Doz toksisiteyi belirleyen ana unsurdur ve bir maddenin toksisitesini ifade etmek üzere LD_{50} değeri kullanılmaktadır. Bu değer özetle spesifik bir şekil ve miktarda verildiğinde, uygulama yapılan deney hayvanı populasyonunun yarısını öldüren doz olarak ifade edilmektedir. Bu değer sayesinde farklı bileşiklerin toksisiteleri mukayese edilebilmektedir.

Sinir ajanlarına bağlı zehirlenmelerde görülen bulgu ve belirtiler; sempatik ve parasempatik ganglionlar ile efektör organlar üzerinde artmış Ach etkileri ile nöromusküler bileşkelerde artmış Ach etkileri sonucu ortaya çıkan depolarizasyon blokları ve santral sinir sisteminde ortaya çıkan depresyon sonucunda meydana gelmektedir. Erken zehirlenmenin dönemiminde, parasempatik semptomlara bağlı kolinerjik kriz belirginleşmeden önce ortosempatik bulgular görülebilir. Bulgu ve belirtilerin ortaya çıkması için geçen süre, maruz kalınan sinir ajanına, maruziyet yoluna ve şiddetine göre değişkenlik gösterir. Bulgu ve belirtiler birbiri üstüne binerek zehirlenme tablosunun beklenenden daha kötü seyretmesine sebep olabilir (28).

Zehirlenme derecesinin değerlendirilmesi maksadıyla geliştirilen Peradeniya Organofosfor Zehirlenme Ölçeği ile en yaygın 5 belirti 0-2 arası değerler ile puanlandırılarak; hastalar ilk başvurduğunda hafif (skor 0-3), orta (skor 4-7) veya şiddetli (skor 8-11) olarak derecelendirilebilmektedir(38). Peradeniya Organofosfor Zehirlenme Ölçeği çizelge 2.4.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Peradeniya Organofosfor Zehirlenme Ölçeği (34).

Parametre	Kriter	Puan
Pupil Çapı	≥2 mm	0
	<2 mm	1
	Toplu iğne başı büyüklüğünde	2
Solunum Hızı	<20 /dk	0
	≥20 / dk	1
	≥20 dk ve santral siyanoz mevcut	2
Kalp Hızı	>60 / dk	0
	41-60	1
	<40 / dk	2
Fasikülasyonlar	Yok	0
	Jeneralize veya Sürekli	1
	Jeneralize ve Sürekli	2
Bilinç Durumu	Bilinci yerinde	0
	Sözlü uyarılara yetersiz yanıt	1
	Sözlü uyarılara yanıtsız	2
Nöbetler	Yok	0
	Var	1

Sinir ajanı zehirlenmesinde etkilenen sistemlere göre belirti ve bulgular çizelge 2.5.'de ve maruziyet şiddeti ve maruziyet yoluna göre belirti ve bulgular çizelge 2.6.'da yer almaktadır (28-30).

Çizelge 2.5. Sinir Ajanı Zehirlenmesinde Etkilenen Sistemlere Göre Belirti ve Bulgular.

Reseptör Tipi	Hedef Organ		Belirti ve Bulgular
Nikotinik	**Otonom Ganglionlar**		Solukluk, taşikardi, hipertansiyon.
	İskelet Kasları		Kas güçsüzlüğü, fasikülasyon, paralizi.
Muskarinik	**Salgı Bezleri**	Nazal Mukoza	Rinore, hiperemi.
		Konjuktival Mukoza	Hiperemi.
		Bronşiyal Mukoza	Bronkore, bronkokonstrüksiyon, dispne.
		Ter Bezleri	Terleme artışı.
		Gözyaşı Bezleri	Göz yaşarması.
		Tükürük Bezleri	Tükürük salgı artışı.
	Düz Kaslar	İris	Miyozis.
		Siliyer Kaslar	Akomodasyon bozukluğu.
		GİS	Bulantı, kusma, diare, mide krampları, istemsiz defekasyon.
		Mesane	İstemsiz ürinasyon.
		Kalp	Bradikardi.
Santral	**Merkezi Sinir Sistemi**		Anksiyete, huzursuzluk, baş ağrısı, baş dönmesi, tremor, konfüzyon, konsantrsyon güçlüğü, konvülsiyon, bilinç kaybı, solunum depresyonu ve solunum arresti.

Çizelge 2.6. Sinir Ajanı Maruziyet Şiddeti ve Maruziyet Yoluna Göre Belirti ve Bulgular

Maruziyet Şiddeti	**Maruziyet Yolu**		
	Buhar	**Cilt**	
Hafif	Miyozis, Rinore, Sekresyon Artışı, Hafif Dispne.	Maruziyet bögesinde artmış terleme ve fasikülasyonlar.	Etkiler 18 saate kadar süren asemptomatik bir evreden sonra ortaya çıkabilir.
Orta	Miyozis, Rinore, Sekresyon Artışı, Hafif Dispne.	Maruziyet bögesinde artmış terleme ve fasikülasyonlar, Bulantı/Kusma, Güçsüzlük.	
Şiddetli	Miyozis, Rinore, Sekresyon Artışı, Şiddetli Dispne, Bilinç Kaybı, Konvülsiyonlar, Jeneralize Fasikülasyonlar, Flask Paralizi, Apne, Nöbetlerle Birlikte İstemsiz Ürinasyon/Defekasyon.	Maruziyet bögesinde artmış terleme ve fasikülasyonlar, Bulantı/Kusma, Güçsüzlük, Bilinç Kaybı, Konvülsiyonlar, Jeneralize Fasikülasyonlar, Flask Paralizi, Sekresyon Artışı, Nöbetlerle Birlikte İstemsiz Ürinasyon/Defekasyon.	Etkiler 2-30 dakikalık asemptomatik bir evreden sonra ortaya çıkabilir.

Sinir ajanlarının maruziyetinden sonra akut ve ölümcül olabilen etkiler merkezi ve periferik sinir sisteminde AChE inhibisyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Bu tablo "Akut Kolinerjik Kriz" adıyla da anılmaktadır. Ani ölümlerden ise genellikle artmış bronş sekresyonu ve alveolar ödemin eşlik ettiği bronkokonstrüksiyon sorumlu tutulmaktadır.

Akut Kolinerjik Krizden 1-4 gün sonra Ach'e bağlı etkilerin yinelemesi veya kas güçsüzlüğünün ortaya çıkması ile karakterize olan tablo "İntermediate (Ara) Sendrom (İMS)" olarak anılmaktadır. İMS'de en çok görülen bulgular boynun fleksiyon hareketinde zayıflık ve farklı şiddetlerde proksimal kasların zayıflığı, omzun abduksiyon hareketi ile kalçanın fleksiyon hareketlerinde zayıflıktır. İMS başlangıcında çoğunlukla solunum yetmezliği görülür. Bunun yanı sıra derin tendon reflekslerinde zayıflama ve kafa sinirlerinin uyardığı yüz kaslarında da zayıflık olmaktadır (37).

OP ile indüklenen gecikmiş nöropati (OPIDN), tekrarlanan OP pestisit maruziyetinin yanı sıra sinir ajanına maruz kalma ile ilişkili nöropsikolojik semptomların bir bileşimi olarak ortaya çıkan durumdur. OPIDN semptomları, OP maruziyetinden haftalar sonra ortaya çıkabilir ve kas zayıflığı, anksiyete, depresyon,

psikozun yanı sıra bilişsel ve hafıza problemlerini içermektedir. OPIDN mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte nöropati hedef esterazın (NTE) inhibisyonunun rol oynadığı düşünülmektedir (38).

Sinir ajanı maruziyetinin tedavisinde; tıbbi dekontaminasyon, acil ventilasyon ile standart tedavi protokolü olarak muskarinik antagonist atropin, merkezi sinir sistemi hasarından korunmak için diazepam veya midazolam gibi bir antikonvülsan ve sinir ajanı ile asetilkolin esteraz arasındaki kovalent bağı açarak enzimi reaktive eden bir oksim preparatı kombine olarak verilir (39).

AChE inhibisyonu ile ortaya çıkan bu tablolar dışında, yapılan in vivo çalışmalar ile subakut, akut ve kronik maruziyetlerde bir çok farklı OP bileşiklerine maruz kalan hayvanlarda oksidatif stresin meydana geldiği doğrulanmıştır (40).

Bu çalışmaların yanı sıra lipid peroksidasyonunun organofosforlu insektisit intoksikasyonunda rol aldığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır (41–44).

2.10. OKSİDATİF STRES

Hücresel metabolik süreçler veya iskemi, yaşlanma, radyasyon, kimyasal ajanlar ve inflamasyon gibi süreçler sonrasında oluşan hidroksil ve süperoksit radikalleri ile hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı karşısında bunların detoksifikasyonunda görevli antioksidan mekanizmaların yetersiz kalmasıyla ortaya çıkan oksidatif denge bozukluğu; oksidatif stres olarak anılmaktadır.

Oksidatif stres artışıyla oluşan reaktif oksijen türleri hücre içinde yer alan nükleik asit bazları, proteinler ve lipitlere oksidasyon yoluyla saldırarak hasarlandırmaktadır.

Oksidatif stres günümüzde inflamatuar hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörolojik hastalıkların etiyopatojenezinden sorumlu tutulmaktadır.

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşlenmemiş bir veya daha fazla elektron bulunan bileşiklerdir. Kısa ömürlü, reaktif ve kararsız bileşiklerdir. Vücudumuzda iki eşlenmemiş elektrona sahip moleküler oksijene demir ya da bakırlı enzimler üzerinden elektron transferi yaparak oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştirir. Dolayısıyla moleküler oksijen ROS oluşumunda büyük paya sahiptir. Başlıca reaktif oksijen türleri süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksittir. Bunlardan ilk ikisi serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidandır (45).

Biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu sonucu hidrojen peroksit üretimi sağlanır. Bu reaksiyonda iki proton alan iki süperoksit molekülü hidrojen peroksit veya moleküler oksijeni oluşturur. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz enzimiyle veya spontan olarak gerçekleşir (46).

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu veya süperoksit radikallerinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşur. Hidroksil radikali en güçlü oksidan olarak bilinmektedir (47).

Fenton Reaksiyonu: $H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{+3}$

Haber-Weiss Reaksiyonu: $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$

Süperoksit radikalleri ise aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur.

$$HO_2 \rightarrow H^+ + O_2^-$$

Bunun yanı sıra geçiş metallerinin oksidasyonu ile de oluşabilmektedir.

$$Fe^{+2} + O_2 \rightarrow Fe^{+3} + O_2^-$$

2.11. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Antioksidanlar; oksijeni, katalitik metalleri ve reaktif oksijen türlerini ortamdan uzaklaştırarak veya etkilerini zayıflatarak, zincir reaksiyonların başlamasını önlemek suretiyle serbest radikal hasarını düzeltici etki gösterirler.

Vücudumuzda serbest radikallerin vereceği hasarın önlenmesi maksadıyla antioksidanlar görev almaktadır. Bunlar eksojen ve endojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar.

1. Eksojen Antioksidanlar: A, C ve E vitaminleridir.

2. Endojen Antioksidanlar: Enzim yapılılar ve enzim yapılı olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

a. Enzim Yapılılar: Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatyon Peroksidaz, Sitokrom Oksidaz.

b. Enzim Yapılı Olmayanlar: Serüloplazmin, Albümin, Transferin, Haptoglobulin, Hemopeksin, Bilirubin, Asetil Sistein, Kuersetin ve Resveratrol.

Glutatyon

Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptid olup vücudumuzda birçok dokuda yüksek düzeyde bulunmaktadır. Oksidatif hasardan korunmada ROS ve peroksit ile reaksiyona girmek suretiyle antioksidan rolü bulunmaktadır.

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Reaktif oksijen türleri ve süperoksit anyonuna karşı en güçlü antioksidandır. Katalize ettiği reaksiyon ile bir süperoksit radikali oksijen molekülüne yükseltgenirken diğeri hidrojen perokside indirgenir.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Lizozomlarda, mitokondride ve damar duvarında olmak üzere sırasıyla SOD1, SOD2 ve SOD3 olarak adlandırılan üç izomeri bulunmaktadır.

Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda yer almaktadır. Mitokondride oluştuktan sonra süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz tarafından parçalanamayan yüksek miktardaki hidrojen peroksit sitozole geçer ve burada katalaz tarafından yıkıma uğratılır.

$$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Dört selenyum atomu içeren tetramerik yapılı bir moleküldür. Özellikle eritrositler açısından oksidatif hasardan koruyucu etkisi bulunmaktadır. Mitokondri ve sitozolde hidrojen peroksidin suya yıkımından sorumludur.

Sitokrom Oksidaz

Süperoksidin yıkımından sorumlu olan bu enzim mitokondride yer almaktadır. Süperoksidin sitokrom oksidaz tarafından yıkımı sürekli devam etmekte ve bu yolla ATP üretimi sağlanmaktadır. Ancak genellikle süperoksit üretimi bu enzimin kapasitesini aşar ve diğer antioksidan mekanizmalar devreye girer (49-51).

2.12. SİNİR AJANLARI ve OKSİDATİF STRES

Birçok çalışma, OP insektisitlerin neden olduğu oksidatif hasar ve antioksidan aktivitenin kanıtlarını göstermiştir, bu da akut OP zehirlenmesinde endojen antioksidan savunmaların tetiklendiğini düşündürmektedir. OP zehirlenmeleri sonrası görülen komplikasyonlar ile oksidatif stres arasında bir ilişki olduğunu varsayan araştırmacılara göre; mitokondriyal disfonksiyon, kas dokularında iskemi reperfüzyonu veya endojen antioksidanların inaktivasyonunun, oksidatif hasardan sorumlu mekanizmalar oldukları değerlendirilmektedir (49).

Vidyasagar ve arkadaşları tarafından organofosforlu insektisitlerle zehirlenme sebebiyle bilinci kapalı olarak hastaneye başvuran 84 hastadan alınan kan örnekleriyle yapılan çalışmada; hastaların süperoksit dismutaz (SOD) ve malonil dialdehit (MDA) seviyelerinde tespit edilen belirgin artış oksidatif stres ile açıklanmıştır (50).

Mishra ve arkadaşları tarafından OP insektisit ilaçlaması yapan 50 işçinin kan örnekleri toplanarak kontrol grubuyla mukayeseli olarak yapılan çalışmada; normal sağlıklı kontrol deneklerine kıyasla, maruziyetin olduğu gruplarda SOD ve katalazda önemli bir artış olduğu ortaya konularak, pestisitlere maruz kalan gruptaki yüksek MDA seviyelerinin yansıttığı lipid peroksidasyonundaki artışın oksidatif stres kaynaklı olduğu belirtilmiştir (51).

Pore ve arkadaşları tarafından organofosforlu insektisitlerle zehirlenme sebebiyle hastaneye yatışları yapılan 40 hastadan alınan kan örneklerinin, farklı yaş grupları ve cinsiyetten sağlıklı 40 kişilik kontrol grubuyla karşılaştırıldığı çalışmada, hastaların SOD ve MDA düzeylerinde tespit edilen belirgin artışın oksidatif strese işaret ettiği belirtilmiştir (52).

Golomb ve arkadaşları tarafından 1990-1991 yıllarında Körfez Savaşına katılmış ve etiyolojisinde düşük dozlarda da olsa organofosforlu bileşik maruziyetine bağlı Körfez Savaşı Hastalığı (GWI) semptomatolojisi gösteren 41 eski askerin kan örnekleri 40 kişiden oluşan kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve anlamlı düzeyde düşük bulunan plazma MDA düzeyleri oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir (53).

Oksidatif stres belirteçleri dışında organofosforlu pestisitlere maruziyeti oksidatif stres ile ilişkilendirilen pek çok hayvan deneyi bulunmakla birlikte insan hücre hatları ile çalışmalar ve subakut veya kronik maruziyetlerle ilgili çalışmalar oldukça sınırlı görülmektedir.

2.13. KAN BEYİN BARİYERİ HÜCRELERİ

İlk defa 1902 yılında Alman mikrobiyoloji uzmanı P.Ehrlich tarafından tanımlanan KBB, beyne her türlü toksik moleküllerden korunma sağlarken gerekli moleküllerin geçişine izin veren özelleşmiş bir sistemdir. Temel olarak endotel hücreleri, astrositler ve perisitler olmak üzere 3 bileşeni bulunmaktadır.

Hücre içi veya hücreler arası madde geçişine kısmen mümkün olduğu periferik kapillerin aksine KBB üzerinden beyin hücrelerine geçiş fiziksel (tight junction (TJ): sıkı bağlantılar) ve metabolik (enzim) bariyeri yoluyla çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Böylece ilaçların beyne geçişi kontrol altında tutulur. Buna ilaveten, KBB harabiyetinin santral sinir sisteminin pek çok hastalığında önemi olduğu vurgulanmıştır. KBB çalışmaları; gittikçe artan bir sıklıkta fizyoloji, patoloji, farmakoloji ve nöroloji ile uğraşan bilim insanlarının ilgi odağı haline gelmiştir (54).

Bununla birlikte geliştirilen yeni ilaçlar veya test edilmek istenilen toksik bileşiklerle in vivo çalışmaların güçlüğü yerini giderek in vitro çalışmalara

bırakmaktadır. Her ne kadar in vitro çalışmalar beynin karmaşık fonksiyonel yapısı karşısında yetersiz gibi görünse de BMVEC hücre hatları kullanılarak, test edilmek istenilen molekülün BMVEC üzerinde toksik etkili olup olmadığını değerlendirmek mümkündür.

Uygun bir KBB modeliyle; KBB metabolizmasının, endojen taşıyıcıların inhibisyonunun ve sekestrasyonun etkileri incelenebilir. Bu bilgiler hem toksisite mekanizmalarının anlaşılması açısından hem de insanlarda risk ve güvenliğin değerlendirilmesinde klinik verilerle karşılaştırıldığında hayvan deneylerinden elde edilen toksikolojik sonuçların değerini artırabilir (55).

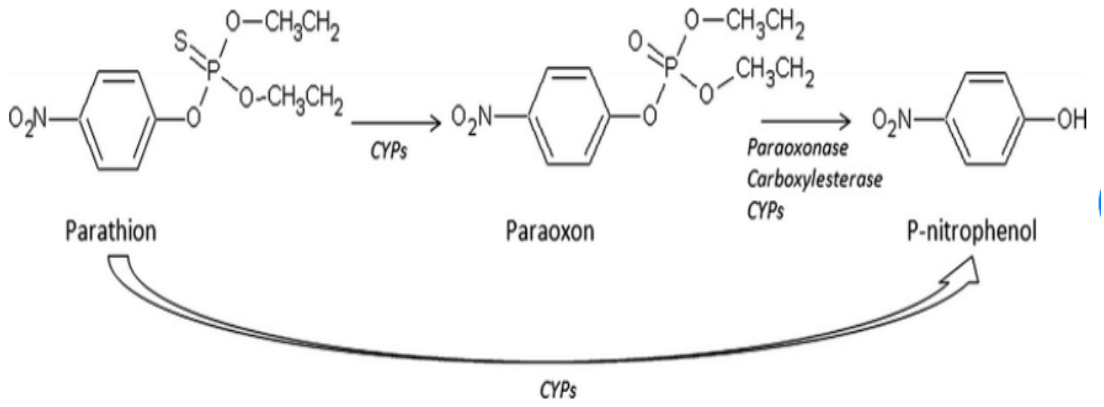
2.14. NÖROBLASTOMA HÜCRELERİ

SH-SY5Y gibi insan nöroblastoma hücre dizileri, yaygın olarak kullanılan bir in vitro model sistemi olup, hücre canlılığı deneyleri, nöronal ultrastrüktür ve çeşitli farmakolojik ajanların test edilmesi gibi çok sayıda nörobilim uygulaması için kullanılmaktadır. İlk kez 1970 yılında nöroblastomalı bir çocuğun kemik iliğinden izole edilen SK-N-SH hücre hattı üç kez alt kültürü yapılarak sırasıyla SH-SY, SHSY5 ve son olarak SH-SY5Y hücre hatları türetilmiştir (56,57).

SH-SY5Y hücre hattı biyokimyasal olarak birçok yönden nöronlarla ortak özellikler taşıdığından çeşitli araştırmalarda nöron modeli olarak kullanılmaktadır.

2.15. PARAOKSON

Antikolinesteraz etkili paraokson, organofosforlu bir bileşik olup parationunun metabolitidir. Kimyasal olarak $C_{10}H_{14}NO_6P$ formülü ile ifade edilmekte olup molekül ağırlığı 275,19 g/mol'dür. Şekil 2.2'de parationun paraokson ve P-nitrofenole metabolize edildiği reaksiyonlar görülmektedir.



Parathion, P450'ler (CYP'ler) tarafından toksik metabolit paraoksona metabolize edilir ve P450'ler, paraoksonazlar ve karboksilesterazlar tarafından paraoksondan PNP'ye veya doğrudan parathiondan PNP'ye detoksifiye edilir.

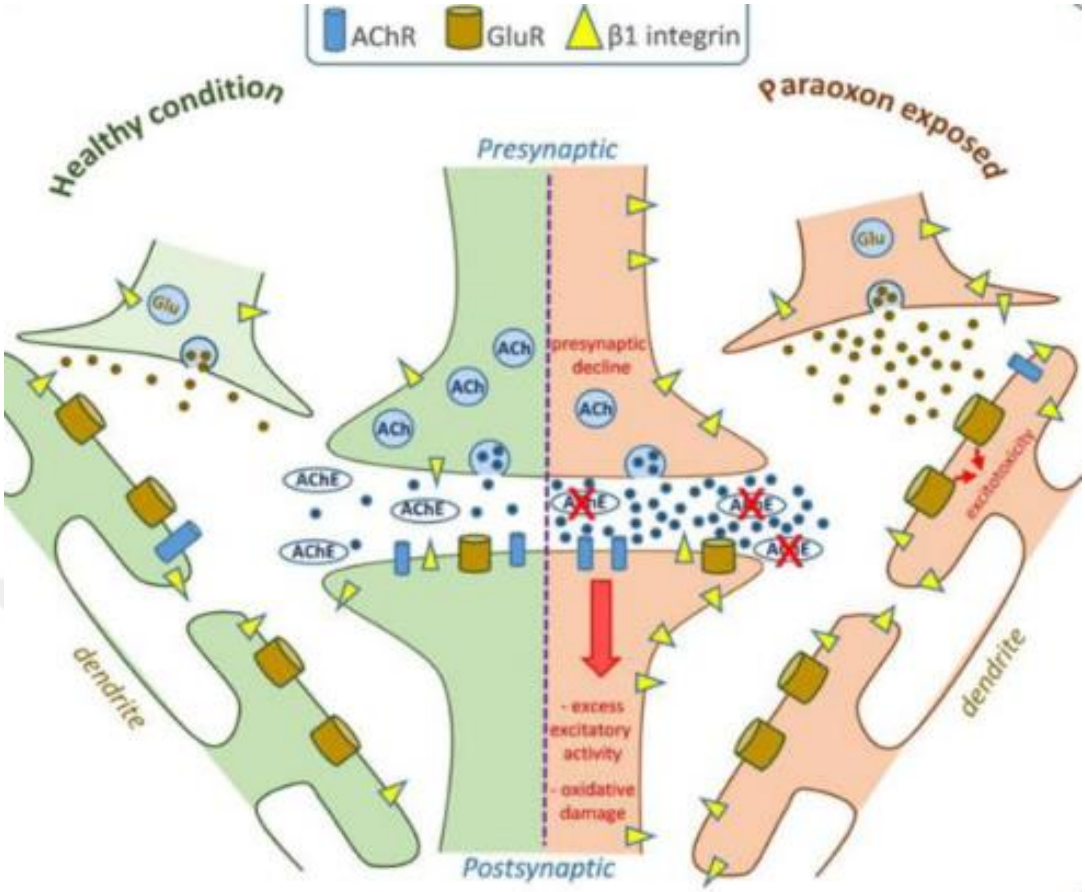
Şekil 2.2. Paration Metabolizması (58).

En potent asetilkolin esteraz inhibitörlerinden biri olan Paraoksonun etkinliği sarinin %70'i kadardır. Bu nedenle insektisit olarak kullanımına son verilmiştir. Günümüzde organofosfat zehirlenmelerinin akut ve kronik etkilerini incelemek maksadıyla kullanılmaktadır (59,60).

Asetilkolinesteraz enzimini güçlü bir şekilde inhibe eder ve glutamat salınımının artmasına, GABA alımının azalmasına, oksidatif hasara ve nörodejenerasyona yol açar. Ortaya çıkan artan asetilkolin birikimi, nöbetleri tetikleyebilir ve beyinde nöronal ve eksitotoksik hasara neden olabilir (61).

Pohanka ve arkadaşları tarafından AChE enzimi esas alınarak 11 organofosforlu bileşiğin (klorpirifos etil, klorpirifos metil, DFP, diklorvos, dimetoate, fention, paraokson etil, paraokson metil, fosalon, pirimifos metil ve pirimifos etil) deteksiyon limitlerinin araştırıldığı bir çalışmada, paraokson-etil, paraokson metil, DFP ve diklorvosun AChE enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettikleri tespit edilmiştir (62).

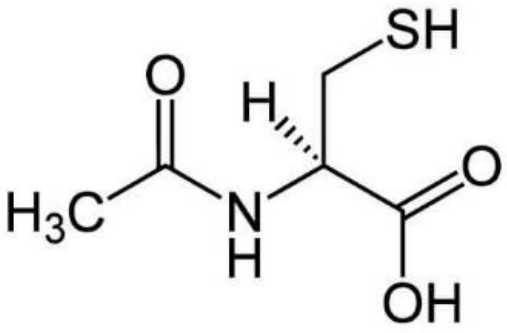
Resim 2.2'de paraokson maruziyeti sonrası sinaptik olaylar görülmektedir. Maruziyet sonrası asetilkolin birikimi ve glutamat salınımında artış, eksisitotoksisiteye ve oksidatif hasara neden olmaktadır.



Resim 2.2 Paraokson Maruziyeti Sonrası Sinaptik Olaylar (61).

2.16. N-ASETİL SİSTEİN (NAC)

Esansiyel aminoasitlerden biri olan L-Sisteinin N-asetilenmiş formu olup tiyollü bir bileşiktir. Kimyasal olarak $C_5H_9NO_3S$ formülü ile ifade edilmekte olup molekül ağırlığı 162,21 g/mol'dür. Şekil 2.3'te kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3. N-Asetil Sisteinin Kimyasal Yapısı.

Oral alım sonrası bağırsaklardan çok yüksek oranda emilir, yarılanma ömrü 5-6 saat kadar olup karaciğerde metabolize edildikten sonra %30 kadarı böbrekten atılırken %10 kadarı ise hiç metabolize edilmeden bağırsaklardan atılmaktadır.

Canlı organizmalar tarafından üretilen ve sülfürlü bir aminoasit olan NAC, güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (63,64).

Sülfür içeren besinlerin detoksifikasyon özellikleri çok eskiden bu yana bilinmektedir. NAC başlıca pestisitleri, parasetamol içeren ilaçları, ağır metalleri (civa, kurşun, kadmiyum), çevresel temizleyicileri (CCL_4), aflatoksin üreten organizmaları detoksifiye edebilmektedir (65).

Antioksidan etkinliğini, GSH düzeylerinin kontrolü, radikallerin ortadan kaldırılması, nötrofil faaliyetini ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α) oluşumunu yavaşlatıp durdurarak göstermektedir (66,67).

NAC ve GSH özellikle akciğerlerin iltihabi durumlarında, nötrofiller nedeniyle oluşan serbest radikaller ile tütün kullanımı ve diğer zehirli kimyasalların inhalasyonu ile ortaya çıkan serbest radikalleri de bağlar. Bu sayede sitoprotektif özelliği de bulunmaktadır (68).

NAC glutatyon biyosentezini uyarır, detosifikasyonu destekler ve doğrudan serbest radikallerin, özellikle oksijen radikallerinin temizleyicisi olarak hareket eder. Güçlü bir antioksidandır ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile karakterize edilen durumlarda potansiyel bir tedavi seçeneğidir (69).

NAC'ın ratlarda düşük dozlarda oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynadığı, yüksek dozlarda ise solunum yollarında hasar ve ölüme neden olduğu gösterilmiştir (70,71).

NAC yapısındaki tiyol grupları ile doğrudan antioksidan etki gösterdiği gibi oksidatif hasara yol açan moleküller ile (hidroksil radikali, hipoklorik asit ve hidrojen peroksit) etkileşerek de antioksidan etki göstermektedir (66,67,72,73).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğünün 2021/138 numaralı ve "Organofosfat Metabolitlerinin İnsan Hücre Kültürlerinde Nörotoksisitesinin Değerlendirilmesi" başlıklı bilimsel proje desteği ile Üniversitemiz Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. KORUYUCU TEDBİRLER

Çalışmada kullanılan organofosfor bileşikleri ile ilgili olarak, hazırlık, testlerin yapılışı ve sonrasındaki tüm işlemler T.KBRN AD Bşk.lığımızda mevcut biyogüvenlik düzeyi 2 laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Güvenlik maksadıyla gerekli koruyucu kişisel donanım kullanılmıştır. Kullanılan malzemeler %5'lik sodyum hipoklorit ile temizlenerek dekontaminasyonları sağlanmış ve oluşan atıklar uygun şekilde bertaraf edilmiştir.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR ve EKİPMAN

1) e-plate / xCELLigence
2) Membran filtre (0,22 µm) MillexGS / İrlanda
3) Mikropipet, Boeco / Almanya
4) Mikroplate okuyucu BioTek ELX 800 / ABD
5) Pipet ucu (5ml) Isolab / Almanya
6) Santrifüj Tüpü (15 ml) Isolab / Almanya
7) Karbondioksit İnkübatörü Nüve EC 160 / Türkiye
8) Buzdolabı Arçelik / Türkiye
9) Mikroplaka Spektrofotometresi Epoch Agilent / ABD

3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER ve REAKTİFLER

1) Aseton, Sigma Aldrich /Almanya
2) Etanol, Sigma Aldrich /Almanya
3) Paraokson Etil, Dr.Ehrenstorfer/ Almanya

4) Paraokson Metil, Dr.Ehrenstorfer/ Almanya

5) N-Asetil Sistein, Sigma Aldrich /Almanya

3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARININ HAZIRLANMASI

Kan Beyin Bariyeri (BMVEC) ve Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hatları; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kök Hücre Araştırma Birimi tarafından pasajlanarak hazırlanmıştır.

3.4.1. HÜCRE HATLARININ ÇOĞALTILMASI

Sıvı azot tankında kriyovial tüp içerisinde dondurulmuş halde saklanan Kan Beyin Bariyeri (BMVEC) (ACBRI/Kırkland WA) ve Nöroblastoma (SH-SY5Y) (CRL-2266, ATCC) hücreleri 37 ºC'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldükten sonra tüp içeriği 15 ml'lik falkon (konik) tüpe aktarılıp ürün hacminin 3 misli oranında fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile karıştırılmıştır. 800 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pelletteki hücreler %10 Fetal Calf Serum (FCS) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kültür besiyeri ile dilüe edilerek 25 cm^2'lik kültür kabına (flask) konulmuş ve 37 ^{0}C %5 CO_2'li etüve kaldırılmıştır.

3.4.2. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Hücreler, kültür kabının yüzeyini %80 oranında kapladığında daha fazla oranda üretmek amacıyla pasajlama işlemi yapılmıştır. Bu işlem için flask içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve 4 ml PBS ilave edilerek hücreler yıkanmıştır. Daha sonra flaska 2 ml tripsin-EDTA (tripsinizasyon) ilave edilerek hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. 6 ml %2'lik PBS ilave edilerek tripsinin etkisi sonlandırılmıştır. Tüm içerik bir falkon tüpe aktarılarak 800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet 2 ml

besiyeri ile dilüe edilmiş ve içerisinde 14 ml besiyeri bulunan 75 cm^2'lik flasklara ekilmiştir.

3.5. PE ve PM'nin ÇÖZÜNECEĞİ ORGANİK SOLVENT ve SOLVENT KONSANTRASYONUNUN MTT YÖNTEMİ ile BELİRLENMESİ

PE ve PM'nin hangi organik çözücüde kullanılacağına karar vermek için öncellikle etanol ve asetonun BMVEC ve SH-SY5Y hücreleri üzerinde toksik olmayan dozunu belirlemek için MTT testi yapılmıştır.

MTT testi öncesi etanol ve asetonun uygulanacağı konsantrasyon hesaplamaları çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

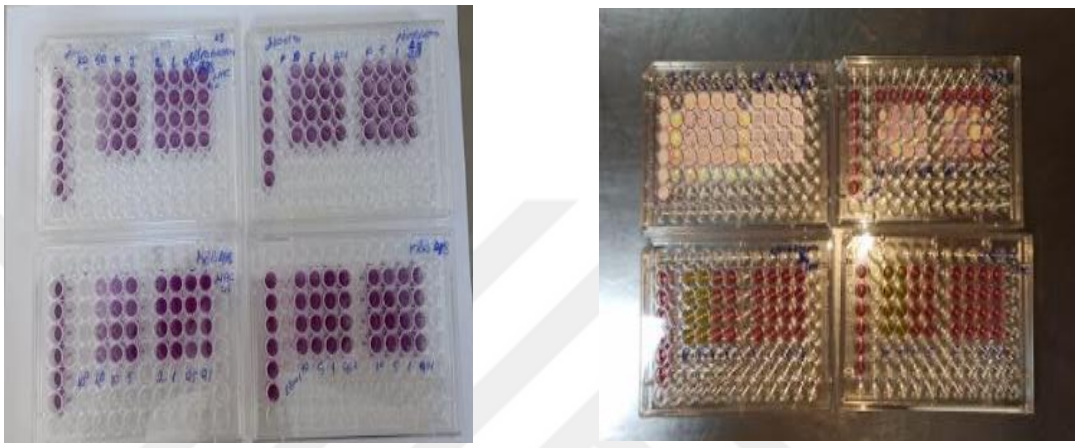
Çizelge 3.1. Etanol ve Aseton Konsantrasyonlarının Hesaplanması.

Çözücü	Miktarı (µl)	DMEM (µl)	Konsantrasyon (%)
Etanol	100	900	10
	50	950	5
	10	990	1
	*%1'lik kons. DMEM ile 10 kat dilüe edilmiştir.		0,01
Aseton	100	900	10
	50	950	5
	10	990	1
	*%1'lik kons. DMEM ile 10 kat dilüe edilmiştir.		0,01

Bu maksatla; hücre sayısı istenilen orana ulaştığında tripsinizasyon işlemi ile pellet haline getirilen hücreler 5 ml besiyeri ile dilüe edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. Bunun için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp 90 µl tripan mavisi ile karıştırılarak 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra Thoma lamında hücreler sayılmıştır. Daha sonra bu sayı; "sulandırma miktarı x 10.000" sayısı ile çarpılarak 1 ml içerisindeki hücre sayısı tespit edilmiştir.

Çok kanallı pipet yardımıyla 96'lık well platelere her bir kuyucukta 20.000 BMVEC ve SH-SY5Y hücresi olacak şekilde 100 µl hücre solüsyonu ekilmiş ve 24 saat etüvde inkübe edilmiştir. (Resim 3.1)

24 saat sonra aseton ve etanolün %0,1, %1, %5, ve %10 konsantrasyonlarındaki [%, v/v (DMEM)] dozlar hücrelere 6 tekrarlı olacak şekilde uygulanarak 24 ve 48. saatlerde MTT yapılmak üzere %5 CO_2'li etüve kaldırılmıştır.



Resim 3.1. Uygulanacak Solvent Konsantrasyonunun Belirlenmesi Maksadıyla Kuyucukların Dizaynı.

3.6. MTT YÖNTEMİ

Etken maddelerin hücrelerin proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksisitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde metabolik aktivite ölçümüne dayalı yöntemdeki 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medyumda hazırlandığında sarımsı bir solüsyon oluşturur. Dehidrogenaz enzimlerince tetrazolium halkasının parçalanması sonrası MTT mor renkteki formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi aracılığı ile olur. Oluşan çözünemeyen formazan, izopropanol yardımı ile çözünür hale getirilir ve spektrofotometrik olarak oluşan renk reaksiyonu kantite edilir.

5 mg/ml olacak şekilde tartılan MTT içerisinde FCS ve Penisilin/Streptomisin olmayan boş medya içerisinde çözünmüş (DMEM) ve 0,22 µl por çaplı filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Her bir kuyucuğa 20 µl MTT solüsyonu pipetlendikten sonra 4 saat 37^0 C ve %5 CO_2'li inkübatörde bekletilmiştir. 4 saat sonunda turuncu renk alan süpernatant dipteki hücrelere zarar vermeden dikkatli bir şekilde aspire edilmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğa 100 µl isopropil alkol ilave edilip plakalar folyo ile sarılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 3-4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda plakalar hafifçe çalkalanmış ve 570 nm dalga boyunda ELISA plaka okuyucuda okutulmuştur.

Testin değerlendirilmesi;

Test edilen hücrelerin canlılık oranı kontrole göre % olarak ifade edilir.

$$\%\ \text{Canlılık Oranı} = \frac{\text{Test Kuyucuğunun Absorbansı}}{\text{Kontrol Kuyucuğunun Absorbansı}}\ \text{X } 100$$

MTT testi sonrası etanolün %2 ve üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığı azaldığının görülmesi üzerine, PE ve PM %2'lik etanol ile hazırlanmıştır.

3.7. PE, PM ve NAC STOK SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI

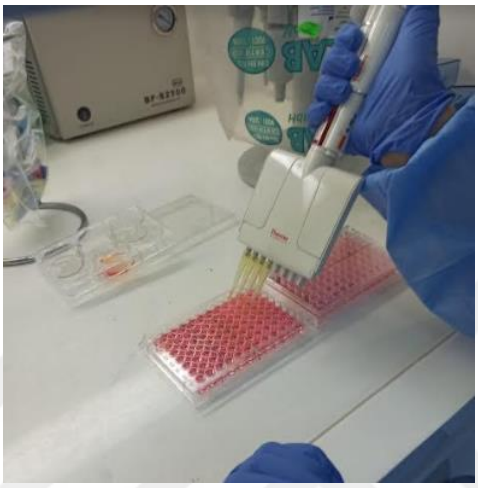
PE: PE'in 5; 2; 1; 0,5; 0,25 ve 0,1 mmolarlık konsantrasyonları hazırlanmıştır.

PM: PM'nin 5; 2; 1; 0,5; 0,25 ve 0,1 mmolarlık konsantrasyonları hazırlanmıştır.

NAC: NAC'ın 100, 50, 10, 5, 2, 1, 0,5 ve 0,1 mmolarlık konsantrasyonları hazırlanmıştır.

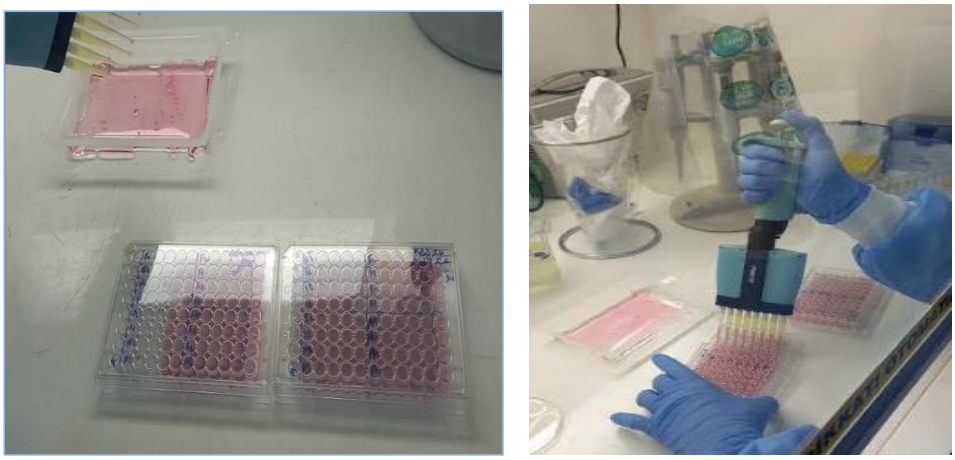
3.8. PE, PM ve NAC'ın BMVEC ve SH-SY5Y HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİSİTELERİNİN MTT YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

BMVEC ve SH-SY5Y hücreleri çok kanallı pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 20 000 hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat etüvde inkübe edilmiştir (Resim 3.2).



Resim 3.2. Çok Kanallı Pipet ile Hücrelerin Ekimi.

Sonrasında PE, PM ve NAC her iki hücre hattına 6 tekrarlı olacak şekilde her bir kuyucuğa 100 µl uygulanmıştır. 24 ve 48. saatlerde MTT yapılmak üzere 37^0 C %5 CO_2'lik inkübatöre alınmıştır. MTT test hazırlık süreci resim 3.3 ve testleri resim 3.4'te yer almaktadır.



Resim 3.3. MTT Testi Hazırlıkları.



Resim 3.4. MTT Test Süreci.

3.9. PE, PM ve NAC'ın IC_{50} DOZLARININ BMVEC ve SH-SY5Y HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ (xCELLigence DENEYİ) ile ÖLÇÜLMESİ

xCELLigence sistemi, elektrik empedansı kullanarak hücre kültürlerinin canlılığını non-invazif bir şekilde izlemek için birbirine bağlı altın mikro elektrotlar içeren özel olarak tasarlanmış mikrotitre plakaları kullanarak çalışmaktadır (74).

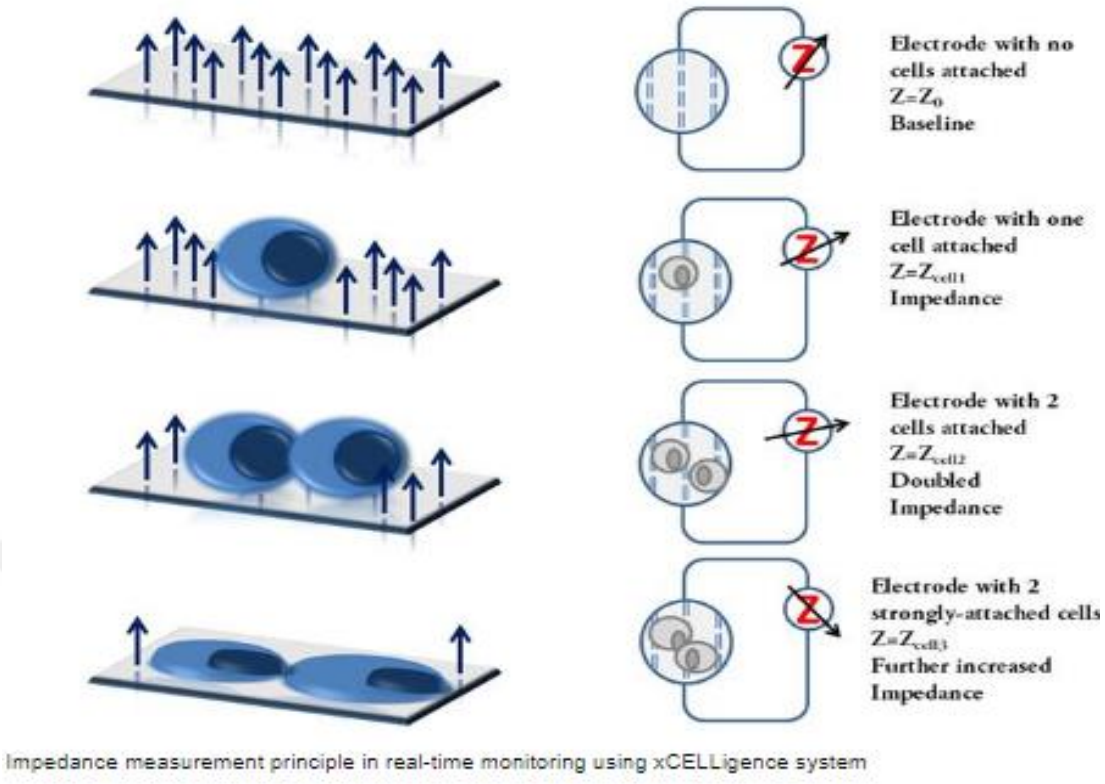
Söz konusu cihaz, resim 3.5'te ve bu cihaz ile empedans ölçüm prensibi resim 3.6'da yer almaktadır.



.

Resim 3.5. xCELLigence cihazı

Bu empedansın sürekli olarak ölçülebilmesi sayesinde hücrelerin kalitesi, canlılık durumları, gelişimleri, sitotoksik ajanlara verdikleri yanıt, morfolojileri vb. biyolojik durumları kantitatif olarak takip edilebilmektedir (75–77).



Resim 3.6. xCELLigence Sisteminde Empedans Ölçüm Prensibi (78).

Çalışmada 16 kuyucuktan oluşan e-plateler kullanılmıştır. Öncelikle her bir kuyucuğa hücre içermeyen, 50 µL besiyeri karışımı konularak cihazda bir bazal okuma yaptırılmıştır. Ardından flasklardan tripsinizasyon ve santrifüj (800 rpm, 5 dakika) yoluyla toplanan hücreler kuyucuklara 100 µL hacim olacak şekilde dikey akımlı biyogüvenlik kabini içerisinde ekildikten sonra plakalar inkübatörün içerisindeki xCELLigence cihazına yerleştirilmiş ve 30 dakikalık zaman aralıkları ile hücre büyümeleri takip edilmiştir. Plaka kuyucuklarının tabanına yerleştirilmiş olan altın plak elektrik akımını kullanılarak bölünen hücrelerin elektrik yük empedansları ölçülmüş ve hücrelerin büyüme indekslerinin tespit edilmesi sağlanmıştır. Hücrelerin hızlı büyüme fazına girmelerinin ardından (Log fazı), plateler dikey akımlı biyogüvenlik kabini içerisine alınarak kontrol grubu dışında deney grubu olarak belirlenen kuyucuklara sitotoksik etkinliği değerlendirilecek PE ve PM 50 µL hacim içerisinde, kombinasyonlar ise 25 µL + 25 µL (Örneğin: 25 µL NAC + 25 µL PM) hacim içerisinde uygulanmıştır. Aynı deney grubu içerisine sadece medyum ve hücre içeren kontrol grubu da ilave edilmiştir. Plakalar yeniden inkübatörün içerisindeki

xCELLigence cihazına yerleştirilmiş ve 30 dakikalık ölçümlere devam edilmiştir. 72 saat süresince okuma yapılmıştır.

xCELLigence testi ile PE, PM ve NAC'ın ve her iki hücre hattındaki sitotoksik değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu maksatla xCELLigence cihazının kendi yazılımından istifade edilmiştir (Resim 3.7).




Resim 3.7. xCELLigence Testleri.

3.10. xCELLigence TESTLERİ İÇİN GRUPLARIN HAZIRLANMASI

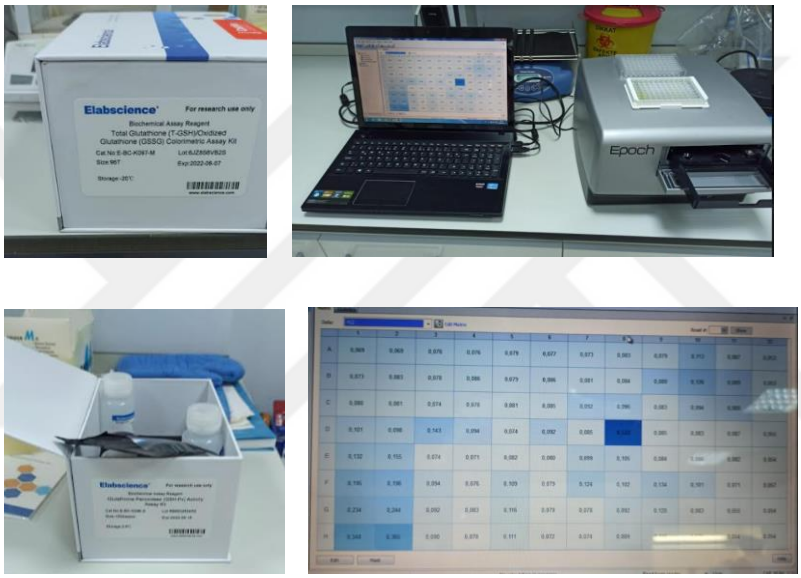
PE ve PM IC_{50} dozları ve NAC'ın 0,25; 0,5; 1 mmolar dozları ile oluşturulan kombinasyonlar ve zaman aralıkları da (24, 48, 72 saat) göz önüne alınarak BMVEC ve SH-SY5Y hücre hatları için çizelge 3.2'deki gruplar oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2. xCELLigence Testi İçin Gruplar

<table>
<tr><td rowspan="2">Grup 1:
Kontrol</td><td colspan="3">OF</td><td colspan="3">NAC (mmolar)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Grup 2:
Yalnız
PE IC_{50}</td><td rowspan="2">Grup 3:
Yalnız
PM IC_{50}</td><td>PE</td><td>Grup 4:
PE IC_{50}+
NAC 0,25</td><td>Grup 5:
PE IC_{50}+
NAC 0,5</td><td>Grup 6:
PE IC_{50}+
NAC 1</td></tr>
<tr><td>PM</td><td>Grup 7:
PM IC_{50}
+ NAC 0,25</td><td>Grup 8:
PM IC_{50}
+ NAC 0,5</td><td>Grup.9:
PM IC_{50}
+ NAC 1</td></tr>
</table>

3.11. OKSİDATİF STRES TESTLERİ

Her bir grup için hücreler (1.10^6 hücre/ ml) 6 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir. 37 ^{0}C sıcaklıkta, %5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübasyondan sonra PE ve PM'nin IC_{50} dozları uygulanan hücrelere 0,5; 1 ve 2 mM dozlarında NAC ilave edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler tripsinize edilerek ortamlarından toplanmıştır. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Pellet 3 ml PBS ile dilüe edilerek -80^0 C'ye kaldırılmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8. Oksidatif Stres Testleri.

3.11.1. GLUTAYON PEROKSİDAZ (GPx) ENZİM AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GPx enzim aktivitesinin değerlendirilmesi ticari kit kullanılarak (Elabscience) kolorimetrik yöntem ile yapılmıştır. Bu kit ile serum, plazma, doku, hücreler, hücre kültürü süpernatant numunelerindeki hücrelerde hidrojen peroksit (H_2O_2)'in yıkımında görevli GPx enzim aktiviteleri ölçülebilmektedir. Glutatyon (GSH) düzeyleri, redükte GSH tüketimi ölçülerek hesaplanmaktadır. Ancak hesaplamalar sırasında H_2O_2 ve redükte GPx aktivitesi olmadan da reaksiyona girebildiğinden,

enzimatik olmayan GSH azalması çıkartılmaktadır. Söz konusu kit bileşenleri çizelge 3.3'te yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Test Kiti Bileşenleri.

Öğe	Bileşen	Miktarı
Reaktif 1	Stok Çözeltisi	2ml x 1 şişe
Reaktif 2	Asit Reaktif	60ml x 4 şişe
Reaktif 3	Fosfat	Toz x 2 şişe
Reaktif 4	DTNB Çözeltisi	30ml x 1 şişe
Reaktif 5	Tuz Reaktif	Toz x 4 şişe
Reaktif 6	GSH Standardı	3,07ml x 2 şişe
Reaktif 7	GSH Standart Stok Seyreltici	6ml x 1 şişe

Test öncesi hazırlık aşamaları çizelge 3.4'te yer almaktadır.

Çizelge 3.4. Test Öncesi Hazırlık Aşamaları1

Aşama	Hazırlanan Solüsyon	İşlem
1.	Reaktif 1 Uygulama Çözeltisi	Reaktif 1 çift damıtılmış su ile 100 kat dilüe edildi.
2.	Reaktif 3 Uygulama Çözeltisi	Bir şişe Reaktif 3 60 ml damıtılmış su ile çözüldü.
3.	Reaktif 5 Uygulama Çözeltisi	Bir şişe Reaktif 5 10 ml çift damıtılmış su ile çözüldü.
4.	GSH Standart Uygulama Çözeltisi	Standart Uygulama Çözeltisi hazırlamak için, Reaktif 7 çift damıtılmış su ile 10 kat dilüe edildi.
5.	1mmol/l GSH Standart Çözeltisi	1 mmol/L GSH Standart Çözeltisi hazırlamak için 1 şişe Reaktif 6, GSH Standart Uygulama Çözeltisi ile 10 ml son hacme kadar çözülerek karıştırıldı.
6.	20µmol/l GSH Standart Çözeltisi	20 µmol/L GSH Standart Çözeltisi hazırlamak için 1 mmol/L GSH Standart Çözeltisi u, GSH Standart Uygulama Çözeltisi ile 50 kat dilüe edildi.

Test için seyreltici olarak PBS (0,01 M, pH 7,4) kullanılmış ve 0,5 ml PBS ile numunelerden 0,5 ml alınarak seyreltilmiştir. Çözeltilerin verdiği absorbanslar 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Yapılan testlerin değerlendirilmesi maksadıyla 37^0 C sıcaklıkta 5 dakika enzim dışı reaksiyon etkisi çıkarılarak 1 μmol/l GSH tüketimini katalize eden 0,1 ml hücre kültürü süpernatantındaki GPx miktarı 1 Ünite olarak hesaplanmıştır.

3.11.2. TOTAL GLUTATYON (T-GSH) DÜZEYİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

T-GSH ölçümü ticari kit kullanılarak (Elabscience) kolorimetrik yöntem ile yapılmıştır. Bu kit ile serum, plazma, doku, tam kan, kırmızı kan hücreleri, hücre kültürü numunelerinin T-GSH ve GSSG içeriği ölçülebilmektedir.

Glutatyon hücrelerde redükte (GSH) ve okside (GSSG) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır. GSSG glutatyon redüktaz tarafından hızla GSH'ye dönüştürüldüğünden fizyolojik koşullar altında hücre içi glutatyonun %98'den fazlası GSH'dir

GSSG glutatyon redüktaz tarafından GSH'ye indirgenir ve GSH, DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkte TNB üretir. Toplam glutatyon miktarı (GSSG+GSH) sarı renkte TNB miktarını belirler. Böylelikle toplam glutatyon 412nm'de Optik Dansite (OD) değeri ölçülerek hesaplanabilir. GSSG'nin içeriği, önce GSH'nin numuneden uygun reaktif ile çıkarılması ve ardından sözü geçen reaksiyon prensibi kullanılarak belirlenmektedir. Bahse konu kit bileşenleri çizelge 3.5'de yer almaktadır.

Çizelge 3.5. Test Kiti Bileşenleri.

Öğe	Bileşen	Miktarı
Reaktif 1	Tampon Çözeltisi	45ml x 2 şişe
Reaktif 2	Standart	6,13mg x 1şişe
Reaktif 3	Protein Çöktürücü	Toz x 1 şişe
Reaktif 4	Enzim Stok Çözeltisi	80µl x 1 şişe
Reaktif 5	Kromojenik Ajan	Toz x 1 şişe
Reaktif 6	Seyreltici	1,8ml x 1 şişe
Reaktif 7	GSH Süpürücü Yardımcı Çözeltisi	2ml x 1 şişe
Reaktif 8	GSH Süpürücü	0,5ml x 1 şişe
Reaktif 9	Substrat	Toz x 1 şişe
	Mikroplaka	96 kuyucuklu
	Plaka kapatıcı	2 adet

Test öncesi hazırlık aşamaları çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Çizelge 3.6. Test Öncesi Hazırlık Aşamaları.

Aşama	Hazırlanan Solüsyon	İşlem
1.	Reaktif 3 Çalışma Çözeltisi	Reaktif 1 ile Reaktif 3 1:19 oranında çözünerek karıştırıldı.
2.	Reaktif 4 Çalışma Çözeltisi	Reaktif 4 ile Reaktif 1 1:19 oranında çözünerek karıştırıldı.
3.	Reaktif 5 Çalışma Çözeltisi	Bir şişe Reaktif 5 1,5ml Reaktif 6 ile çözüldü.
4.	Reaktif Çalışma Çözeltisi	Reaktif 4 çalışma çözeltisi, Reaktif 5 çalışma çözeltisi ve Reaktif 1; 1:1:25 oranında karıştırıldı.
5.	Reaktif 7 Çalışma Çözeltisi	Reaktif 7 1:1 oranında çift damıtılmış su ile seyreltildi.
6.	Reaktif 8 Çalışma Çözeltisi	Reaktif 8 mutlak etanol ile 1:9 oranında seyreltildi.
7.	Reaktif 9 Stok Çözeltisi	1 şişe Reaktif 9, 100 µl çift damıtılmış su ile çözüldü.
8.	Reaktif 9 Çalışma Çözeltisi	Reaktif 9 Reaktif 1 ile 1:79 oranında dilüe edildi.
9.	1mmol/l Standart Stok Çözeltisi	1 şişe Reaktif 2, 10 ml çift damıtılmış su ile çözüldü.
10.	20µmol/l Standart Çözeltisi	1mmol/l Standart Stok Çözeltisi, Reaktif 3 çalışma çözeltisi ile 1:49 oranında dilüe edildi.

Test için seyreltici olarak Reaktif 3 Çalışma Çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltilerin verdiği absorbans değerleri 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hücreler PE ve PM'nin IC_{50} dozları ile NAC'ın 0,5; 1 ve 2 mmolar dozlarına maruz bırakılmıştır.

Testin Yapılışı: Test için öncelikle 20 µmol/L standart çözeltisi reaktif 3 çalışma çözeltisi ile dilüe edilmiştir. Ardından standart kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda 10 µl standart çözeltisinden ve numune kuyucuklarına 10 µl numune alınarak her kuyucuğa 150 µl reaktif çalışma çözeltisi eklenip 25^0C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak her kuyucuğa 50 µl reaktif 9 çalışma çözeltisi eklenerek mikroplaka okuyucu ile 5 saniye karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edilerek her kuyucuğun verdiği absorbans değeri 412 nm'de ölçülmüştür.

Testlerden elde edilen verilerden hareketle, GPx enzim aktivitesi ve T-GSH düzeylerinin belirlenmesi amacıyla, standart çözeltilerin konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerlerinden hareketle standart eğri oluşturulmuş ve regresyon analizi yardımıyla hesaplamalarda kullanılacak denklemler elde edilmiştir. Bu denklemler kullanılarak numunelerin verdiği absorbans değerlerine karşılık gelen enzim aktivitesi ve düzeyler hesaplanmıştır.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Hücre hatlarında PM ve PE'in IC50 değerlerinin hesaplanmasında Probit Log Grafik yöntemi kullanılmıştır. xCELLigence testlerinden xCELLigence RTCA yazılımı ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) programı ile gerçekleştirilerek gruplar arası farklılıklar tek yönlü ANOVA varyans analizi ve Tukey's post-hoc analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri $p<0,05$ olarak alınmıştır. Oksidatif stres testlerinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ise SPSS (Windows Standart Version 23.0) programı kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmış, anlamlılık değeri $p<0,05$ olan sonuçlara Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MTT TEST SONUÇLARI

4.1.1. ETANOL ve ASETONUN SİTOTOKSİSİTESİ

Hücre hatları hazırlandıktan sonra kullanılacak organik solvent ve konsantrasyonunun tespiti için hücre hatları hazırlandıktan sonra PE ve PM'yi çözmek için kullanacağımız organik solvent ile konsantrasyonun tespiti için Etanol ve Asetonun %0,01; %0,5; %1; %2; %5 ve %10'luk konsantrasyonları ilgili hücre hatlarına uygulanmıştır. Bu uygulama sonrası hücre hatlarının belirlenen canlılık oranları çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Etanol ve Aseton Çözeltilerinin Çeşitli Konsantrasyonlarda SH-SY5Y ve BMVEC Hücre Hatlarında Sitotoksisitesi.

Hücre Hattı	Kullanılan Çözelti (v/v)	Ölçüm Zamanı (Saat)	Hücre Canlılığı (%)
SH-SY5Y	%2 Etanol	24	98
		48	105
	%5 Etanol	24	93
	%2 Aseton	24	96
		48	79
	%5 Aseton	24	75
BMVEC	%2 Etanol	24	103
		48	94
	%5 Etanol	24	95
	%2 Aseton	24	98
		48	80
	%5 Aseton	24	88

MTT testi sonrası etanolün %2 ve üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığı azaldığının görülmesi üzerine, PE ve PM çözeltileri %2'lik etanol ile hazırlanmıştır.

4.1.2. PM ve PE'nin IC_{50} DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

Etanol konsantrasyonu %2'nin üzerinde toksik olduğundan, bu değerin altındaki konsantrasyonlar kullanılmıştır. Literatür bilgisinden de istifade ederek PE ve PM'nin IC_{50} değerlerini bulmak için sırasıyla 0,2; 0,5; 1; 2; 4 ve 10 mmolar dozları hücre hatlarına uygulanmıştır. Bu uygulama sonrası bulunan IC_{50} değerleri çizelge 4.2'de yer almaktadır.

Çizelge 4.2. PE ve PM'nin IC_{50} Değerleri. ($p<0,05$)

Hücre Hattı	OF	Ölçüm Zamanı (Saat)	IC_{50} Değeri (mmolar)	Etanol Konsantrasyonu (%)
SH-SY5Y	PM	24	0,5	<%1,5
		48	0,5	
	PE	24	0,6	
		48	0,72	
BMVEC	PM	24	0,66	
		48	0,5	
	PE	24	0,76	
		48	0,5	

4.1.3. NAC'ın SİTOTOKSİSİTESİ

Hücre hatlarında NAC'ın hangi konsantrasyona kadar sitoprotektif ve hangi konsantrasyonun üzerinde sitotoksik olduğunu değerlendirmek için sırasıyla 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 50 ve 100 mmolar konsantrasyonları BMVEC ve SH-SY5Y hücre hatlarına uygulanmıştır. Bu uygulama sonrası hücre hatlarının canlılık oranları çizelge 4.3'te yer almaktadır.

Çizelge 4.3. NAC'ın Sitotoksisitesi. ($p<0,05$)

Hücre Hattı	Ölçüm Zamanı (Saat)	NAC Konsantrasyonu (mmolar)	Hücre Canlılığı (%)
BMVEC	24	1	104
		2	98
	48	1	96
		2	92
SH-SY5Y	24	1	106
		2	95
	48	1	95
		2	83

4.2. xCELLigence TEST SONUÇLARI

Sitotoksisite deneyleri sonrası, PM ve PE'nin IC_{50} dozları, her iki hücre hattına uygulanmıştır. Bu esnada NAC'ın 0,25; 0,5 ve 1 mmolarlık dozlarının hem tek başına hem de PE ve PM'ye karşı sitoprotektif etkisi değerlendirilmiştir.

xCELLigence test planlaması çizelge 4.4'de yer almaktadır.

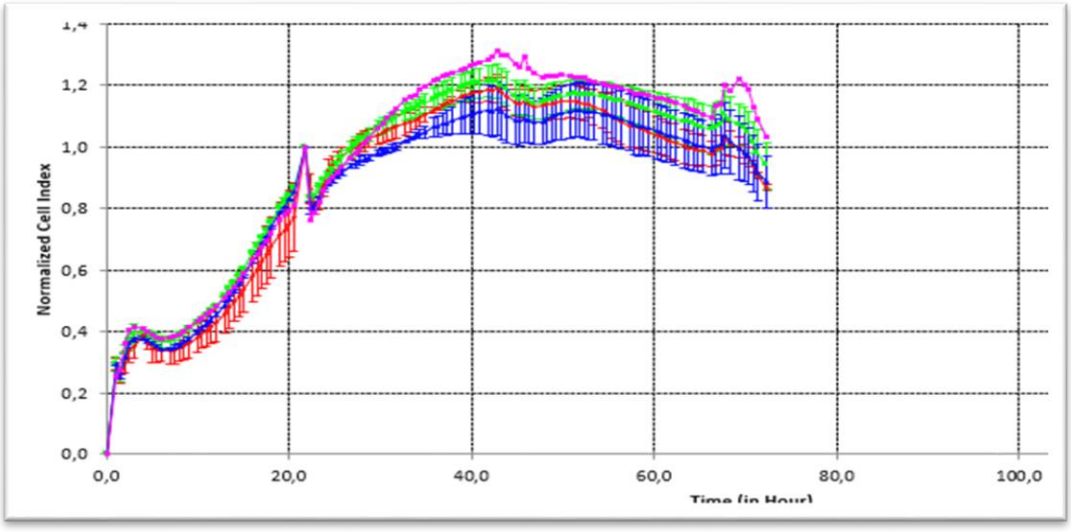
Çizelge 4.4. xCELLigence Testlerinin Planlaması.

Hücre Hattı	NAC	PE	PM	Grup Adı
SH-SY5Y	+	-	-	SH-SY5Y/NAC
	+	+	-	SH-SY5Y/PE/NAC
	+	-	+	SH-SY5Y/PM/NAC
BMVEC	+	-	-	BMVEC/NAC
	+	+	-	BMVEC/PE/NAC
	+	-	+	BMVEC/PM/NAC

4.2.1. SH-SY5Y HÜCRE HATTI TESTLERİ

4.2.1.1. SH-SY5Y/NAC

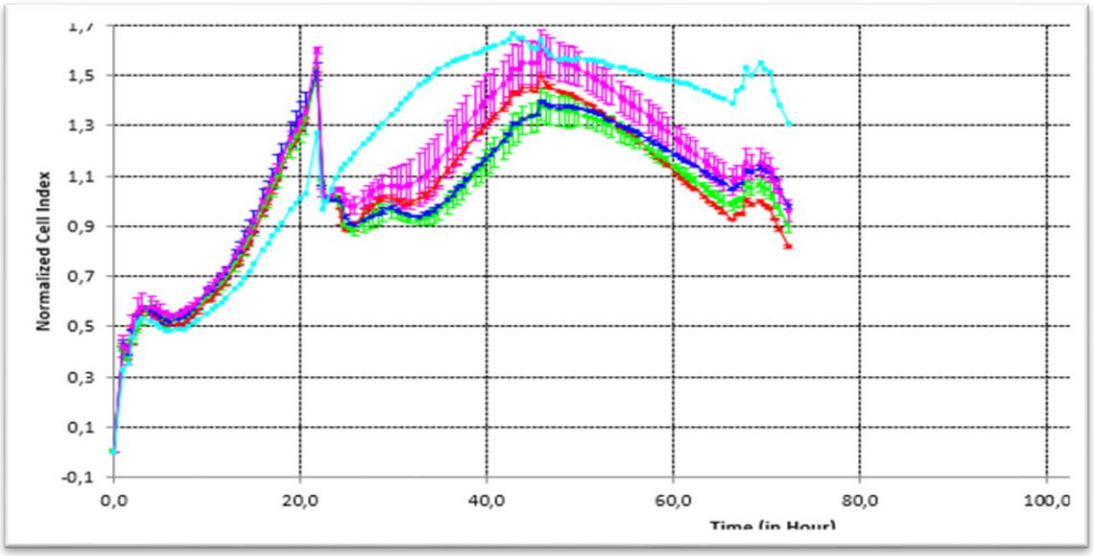
NAC'ın SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.1'de yer almaktadır. NAC kısa sürede hücre sayısını %50'nin altına düşürmediği için sitotoksik değildir. Ayrıca 48. saatten sonra hücre canlılığını arttırmaktadır.



Şekil 4.1. SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. (p<0,05)
(Mavi: NAC1, Yeşil: NAC 0,5, Kırmızı: NAC 0,25, Pembe: Kontrol)

4.2.1.2. SH-SY5Y/PE/NAC

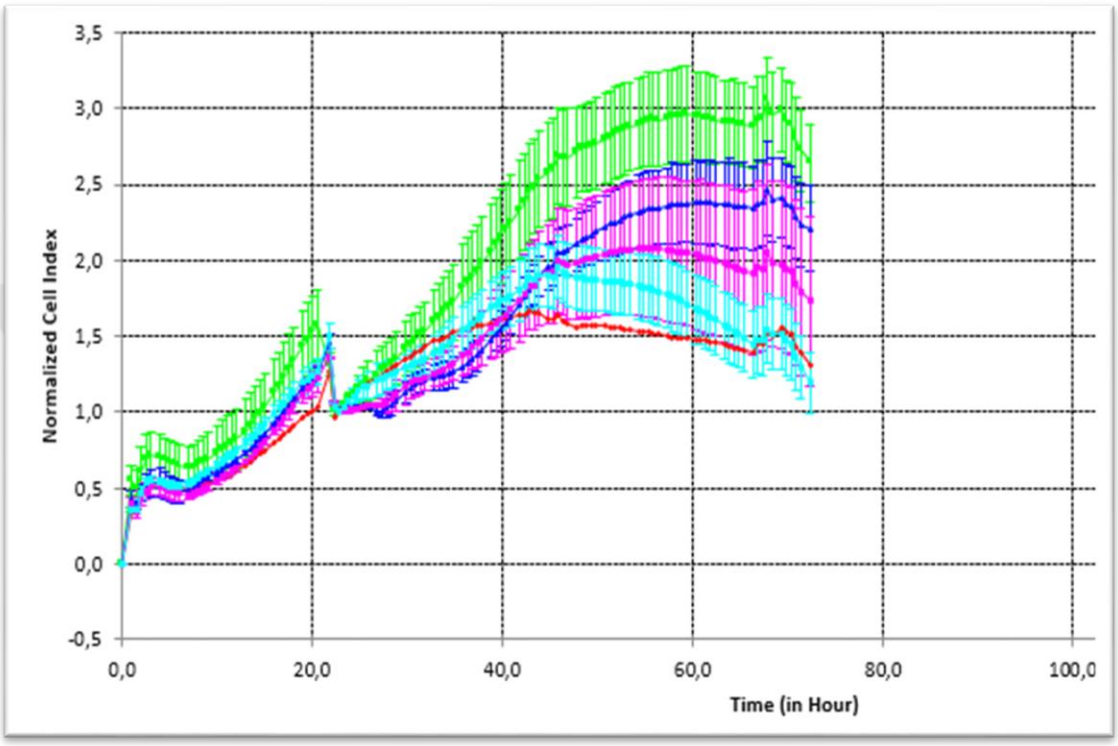
NAC'ın IC_{50} dozunda PE uygulanmış SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.2'de yer almaktadır. PE'in zaten toksik etki gösterdiği 33. saatten sonra artık tüm konsantrasyonlarda NAC dozuna bağlı olarak proliferatif etki görülmektedir.



Şekil 4.2. PE Uygulanmış SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. (p<0,05)
(Pembe: NAC 0,25, Yeşil: NAC 0,50, Mavi: NAC 1, Kırmızı: PE)

4.2.1.3. SH-SY5Y/PM/NAC

NAC'ın IC_{50} dozunda PM uygulanmış SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.3'te yer almaktadır. NAC'ın etkisi 20. saatten itibaren görülmeye başlamaktadır. Doza bağımlı olarak NAC konsantrasyonları etki göstermektedir.

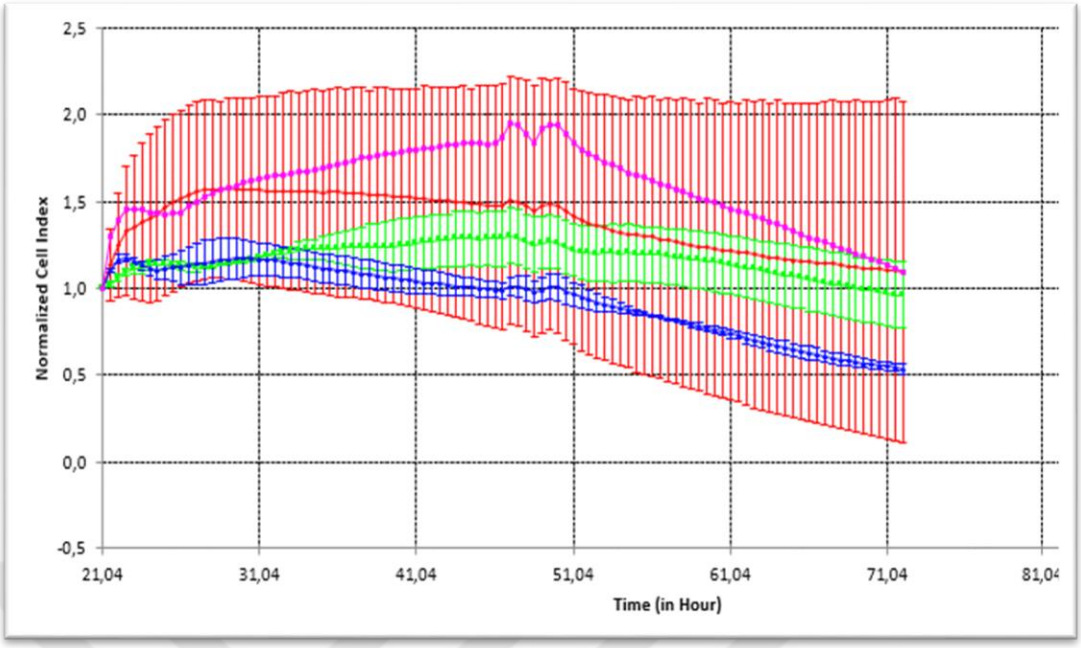


Şekil 4.3. PM Uygulanmış SH-SY5Y Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. ($p<0,05$) (Yeşil: NAC 1, Mavi: NAC 0,5, Pembe: NAC 0,25, Kırmızı: Kontrol)

4.2.2. BMVEC HÜCRE HATTI TESTLERİ

4.2.2.1. BMVEC/NAC

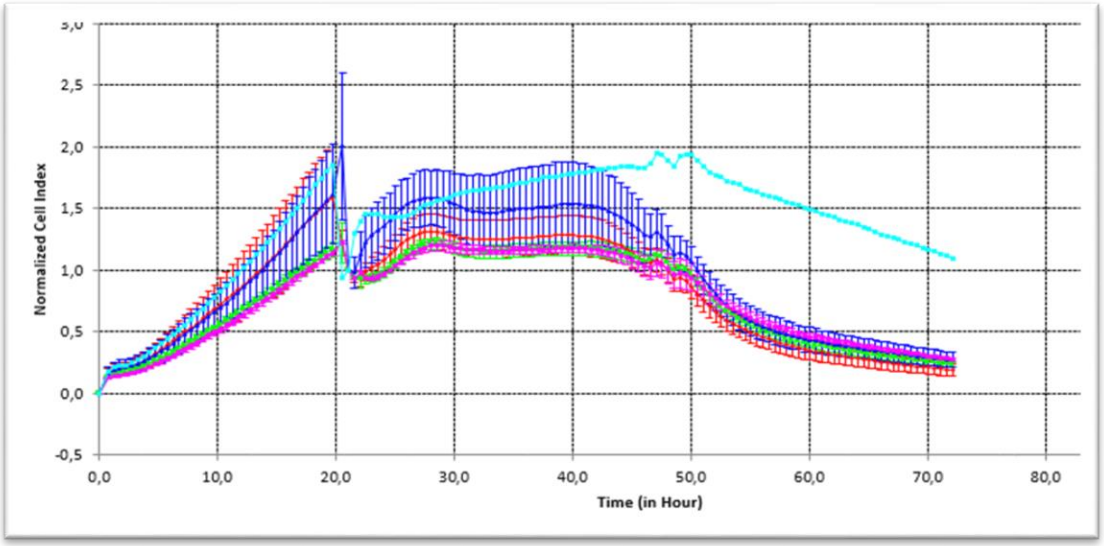
NAC'ın BMVEC hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.4'te yer almaktadır. BMVEC hücre hattında NAC SH-SY5Y hücre hattında olduğu kadar sitoprotektif etki göstermedi. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Sitotoksik olmadığı gibi iyileştirici bir etkisi de yanı sıra dozla değişen bir etkisi de bulunmamaktadır.



Şekil 4.4. BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'in Etkisi. ($p<0,05$)
(Pembe: NAC 1, Mavi: NAC 0,5, Yeşil: NAC 0,25)

4.2.2.2. BMVEC/PE/NAC

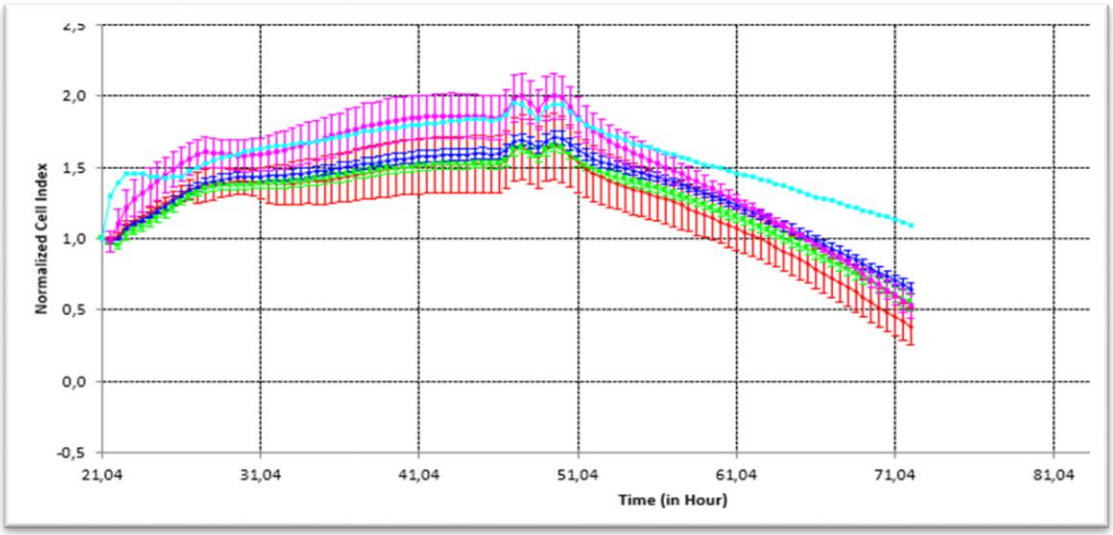
NAC'ın IC_{50} dozunda PE uygulanmış BMVEC hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.5'te yer almaktadır. BMVEC hücre hattına ilk 24 saatte NAC uyguladıktan sonra hemen etkinlik ortaya çıkmakta iken 24. saatin sonunda bu etkinlik azalmaktadır. İstatistiksel olarak doz bağımlı etkisi bulunmaktadır. Buna göre çok düşük dozlarda etkinlik yok iken yüksek dozlarda etkili olmaktadır.



Şekil 4.5. PE Uygulanmış BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. ($p<0,05$) (Mavi: NAC 1, Kırmızı: NAC 0,5, Yeşil: NAC 0,25, Pembe: PE, Turkuaz: Kontrol)

4.2.2.3. BMVEC/PM/NAC

NAC'ın IC_{50} dozunda PM uygulanmış BMVEC hücre hattı üzerindeki etkisi şekil 4.6'de yer almaktadır. BMVEC hücre hattı üzerindeki proliferatif etkisi ilk 48 saatte gözlemlenmektedir. 48. saatten sonra bu etkinlik azalmaktadır.



Şekil 4.6. PM Uygulanmış BMVEC Hücre Hattı Üzerinde NAC'ın Etkisi. ($p<0,05$) (Turkuaz: Kontrol, Pembe: NAC 1, Mavi: NAC 0,5, Yeşil: NAC 0,25, Kırmızı: PM)

4.3. OKSİDATİF STRES TEST SONUÇLARI

PM ve PE'nin IC_{50} dozları ile NAC'ın 0,5, 1 ve 2 mmolarlık dozları SH-SY5Y ve BMVEC hücre hatlarına uygulanarak GPx enzim aktivitesi ve T-GSH düzeyleri ölçüldü.

4.3.1. SH-SY5Y HÜCRE HATTI UYGULAMA SONUÇLARI

T-GSH için 24.saatte çok belirgin bir artış olduğu yani oksidatif stresin başladığı ve NAC uygulamasının bu artışı negatife çevirdiği ve kontrole yakın hale getirdiği görülmektedir. Ancak 48 ve 72. saatlerde oksidatif streste artış gözlenmemiştir. Bu noktada NAC'ın özellikle ilk 24 saatte verilmesinin olumlu etkisi olduğu değerlendirilmektedir (Şekil 4.7 ve 4.8).

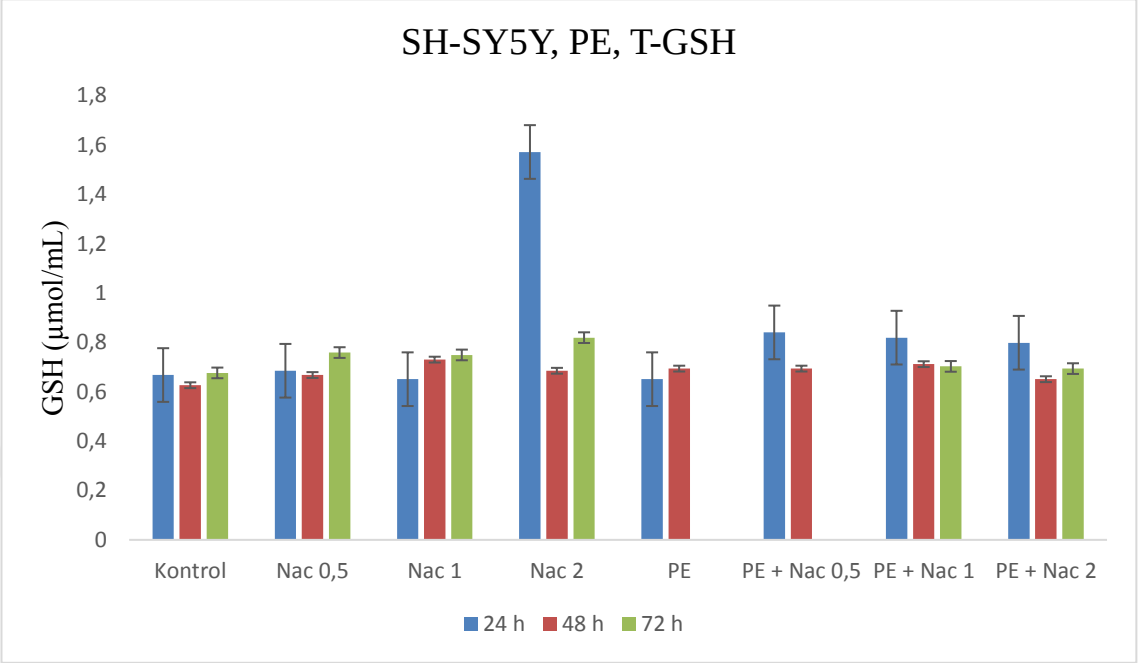
GPx enzim aktivitesi sonuçlarına baktığımızda PE uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde doza bağlı olarak GPx aktivitesinde azalma olduğu görülmektedir. Ancak bu azalma NAC eklenmesiyle artma yönünde seyir göstermiştir. Sonuç olarak istatistiksel olarak bir fark görülmemekle birlikte NAC eklenen hücrelerde enzim aktivitesinde artış görülmektedir.

PM uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde de GPx aktivitesinde özellikle ilk 24 saatte kontrole kıyasla belirgin bir şekilde azalma görülmektedir. Ancak bu etki 48 ve 72 saatlik uygulamalarda 24 saatlik uygulamada olduğu kadar belirgin görülmemekte, hatta 72. saatte kontrole kıyasla enzim aktivitesinde artış gerçekleşmiştir. NAC uygulanması 24. saatte daha belirgin olarak gözlenen aktivite azalması başta olmak üzere her üç ölçüm zamanında da (24, 48 ve 72. saatlerde) enzim aktivitesinde artışa sebep olmuştur.

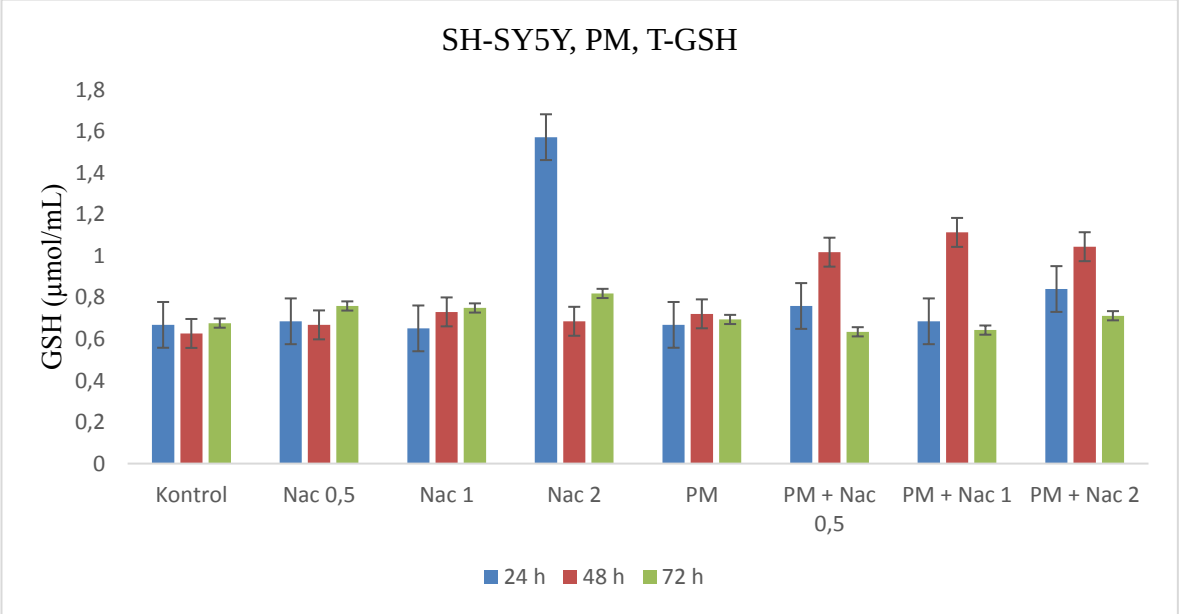
Sonuç olarak hem PE hem de PM'nin 24 saatlik uygulamada daha belirgin bir şekilde enzim aktivitesinde azalmaya yol açtıkları ancak bu azalmanın 48 ve 72. saatlerde beklenildiği kadar belirgin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

Bu sonuçlar bir süre sonra hücrelerde tolerans gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte SH-SY5Y hücrelerinde görülen enzim aktivite

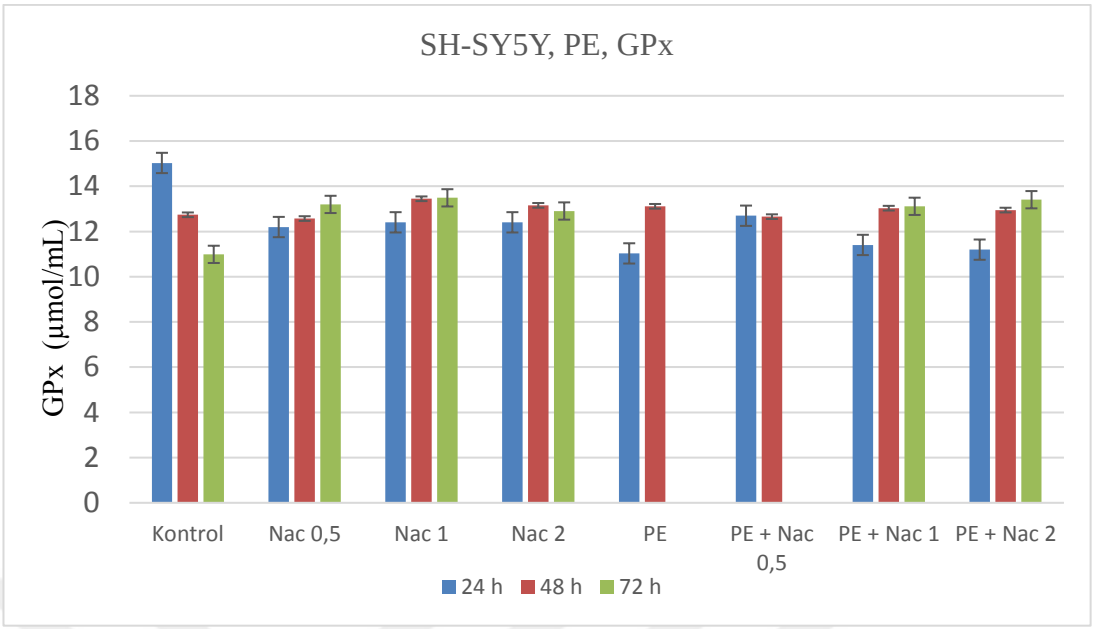
azalmasının NAC ilave edilmesiyle yavaşladığı ve artma yönünde etki gösterdiği görülmektedir.



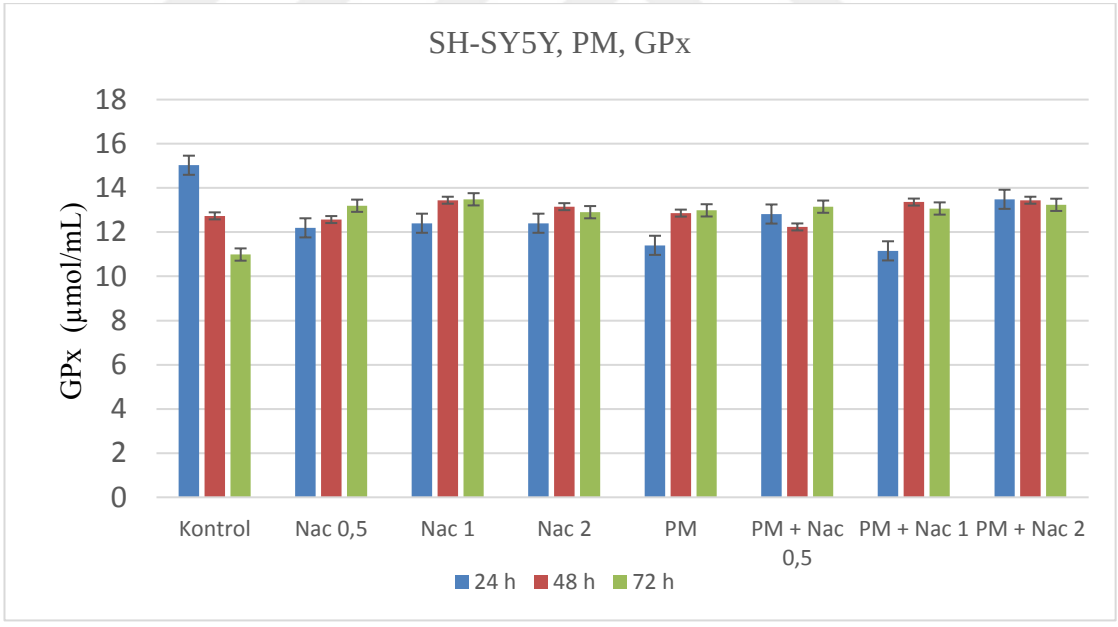
Şekil 4.7. PE ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. ($p<0,05$)



Şekil 4.8. PM ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. ($p<0,05$)



Şekil 4.9. PE ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. ($p<0,05$)

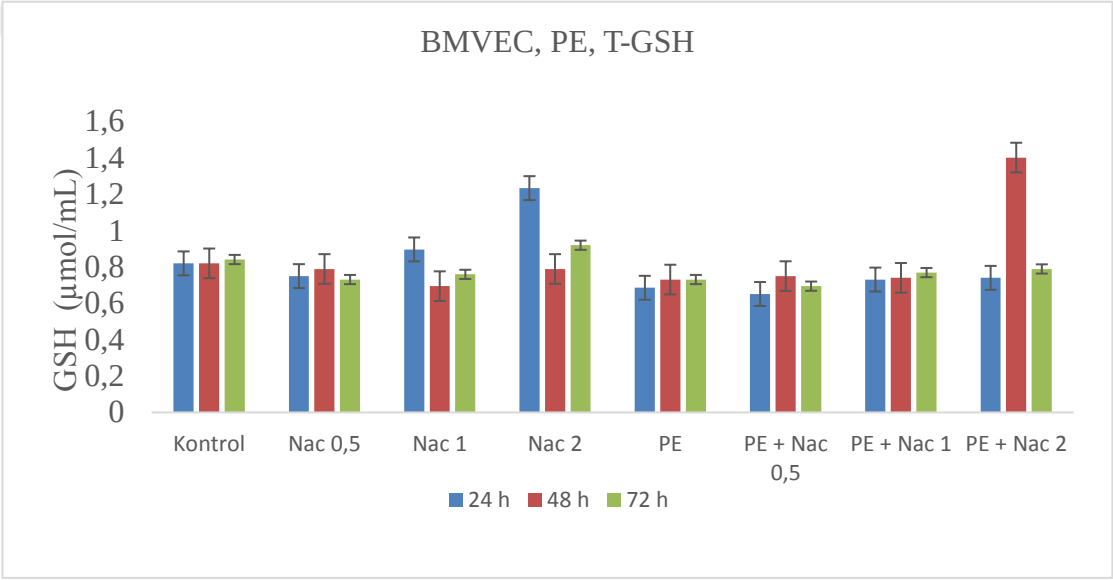


Şekil 4.10. PM ve NAC Uygulanan SH-SY5Y Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. ($p<0,05$)

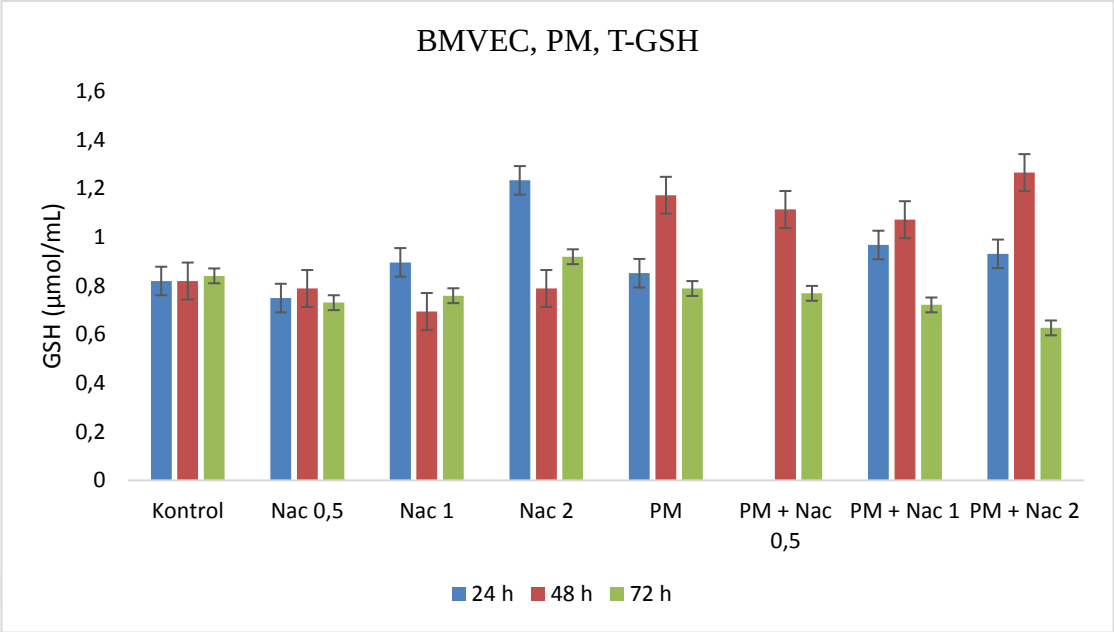
4.3.2. BMVEC HÜCRE HATTI UYGULAMA SONUÇLARI

T-GSH düzeyinin 24 saatlik maruziyette SH-SY5Y hücrelerine benzer şekilde daha belirgin olarak arttığı ve NAC uygulamasının bu artışı tersine çevirdiği görülmektedir. 48 ve 72 saatlerde artış görülmekle birlikte bunun kontrole göre çok belirgin olmadığı gözlenmektedir. (Şekil 4.11 ve 4.12)

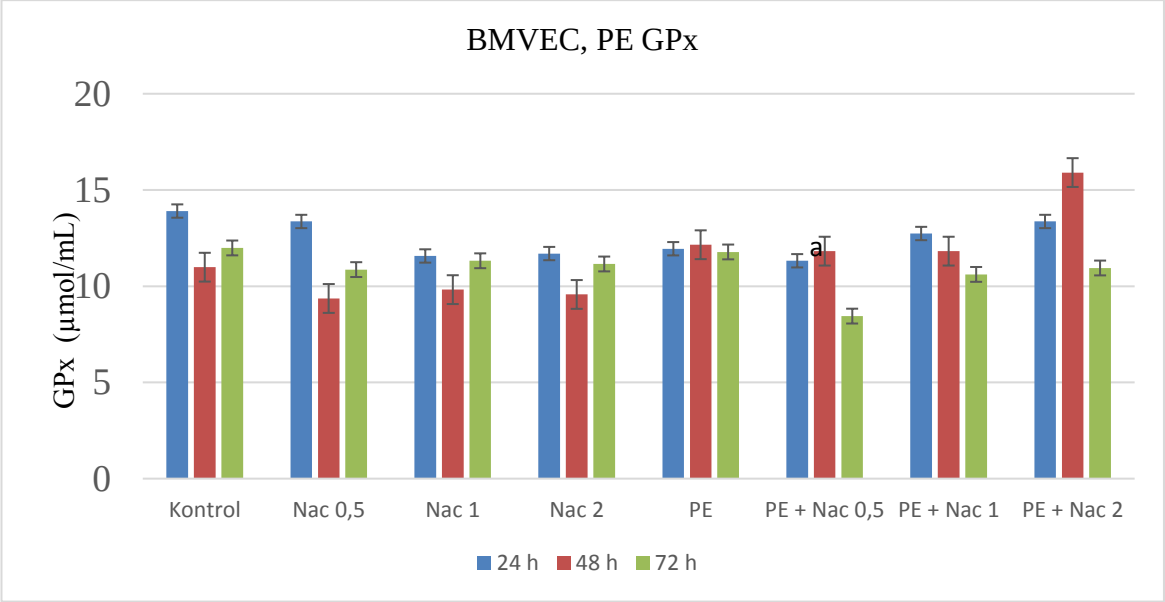
BMVEC hücrelerinde GPx aktivitesinde belirgin bir değişiklik tespit edilememiştir. Sadece 48 saatlik maruziyette kontrole kıyasla bir artış görülmektedir (Şekil 4.13 ve 4.14).



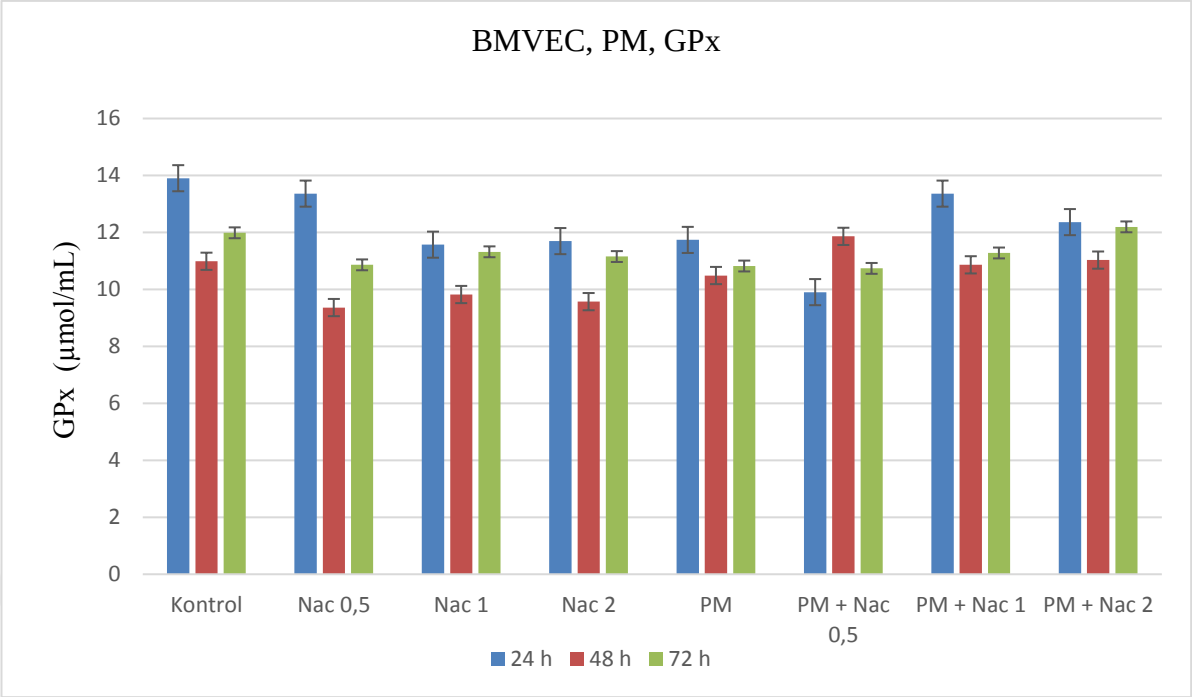
Şekil 4.11. PE ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. ($p<0,05$)



Şekil 4.12. PM ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında T-GSH Düzeyleri. ($p<0,05$)



Şekil 4.13. PE ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. ($p<0,05$)



Şekil 4.14. PM ve NAC Uygulanan BMVEC Hücre Hattında GPx Enzim Aktiviteleri. ($p<0,05$)

5. TARTIŞMA

Çalışmada öncelikle PE ve PM çözeltileri için hücre hattında toksik etki yaratmayacak düzeyde kullanılacak solventin hangisi olacağı ve bu solventin konsantrasyonunun ne olması gerektiği hesaplanarak %2'lik etanol konsantrasyonu ile çalışmaya karar verilmiştir. Ardından MTT testi ile PE, PM ve NAC'ın; önceden belirlenen dozları ile SH-SY5Y ve BMVEC hücre hatlarında 24 ve 48. saatlerdeki IC_{50} değerlerini hesaplanmıştır. Buradan elde edilen IC_{50} değerleri ile xCELLigence testlerini gerçekleştirilerek NAC'ın SH-SY5Y ve BMVEC hücrelerinde hücre canlılığının artmasına katkı sağladığını gözlemlenmiştir. Son olarak GPx ve T-GSH testleri ile PM ve PE'nin her iki hücre hattı üzerinde oksidatif dengenin bozulmasına sebep olduğu gösterilerek; NAC'ın organofosforlu bileşiklerin SH-SY5Y ve BMVEC hücrelerinde sebep olduğu oksidatif stresten korunmada antioksidan etkinliği incelenmiştir.

Oksidatif stres belirteçleri dışında organofosforlu pestisitlere maruziyeti oksidatif stres ile ilişkilendirilen pek çok hayvan deneyi bulunmakla birlikte insan hücre hatları ile çalışmalar oldukça sınırlı görülmektedir. Bununla beraber insan hücre hatları ile çalışmanın birtakım sakıncaları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi hücresel düzeyde bulduğunuz sonuçlar ile vücudumuzda pek çok farklı sistemin dahil olduğu moleküler düzeyde karmaşık reaksiyonlar sonrası ortaya çıkacak yanıtlar arasında farklılıklar olabileceğidir. Bu nedenle hücre hattı çalışmalarının birkaç kez tekrarlanması ve özellikle toksisite çalışmalarında, hücre hatları üzerinde toksik etki göstererek sonuçları etkileyebilecek tüm bileşenlerin hesaba katılması gerekmektedir.

Bu noktada sıcaklık, CO_2 düzeyi vb. ortam koşullarından sonra hücre hatlarında kullanılan solventlerin seçimi dikkat edilmesi gereken ilk husus olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca solventlerin sadece in vitro çalışmalarda değil, kazayla veya intihar amaçlı pestisit zehirlenmelerinde de alınan pestisitten bağımsız toksik etkilerinin de olabileceğinin ayrı bir tartışma konusu olarak hatırda tutulması gerektiği değerlendirilmektedir (79). Timm ve arkadaşları solvent seçimine dikkati çeken araştırmacılar arasında yer almaktadır. Hücre bazlı deneylerde çözücülerin

kullanımına ilişkin hususları inceledikleri çalışmada; düşük konsantrasyonlarda bile solventler tarafından indüklenen etkilerin, hücre tahlillerinde değerlendirilen etkilerin yorumlanması için oldukça önemli olduğu sonucuna vardıklarını belirterek, hücre bazlı analizlerde araştırılan herhangi bir bileşiğin seri seyreltmesinde çözücü konsantrasyonlarını sabit tutmanın önemini vurgulamışlardır (80).

Günümüzde deney hayvanlarının kullanımına getirilen sınırlamalar nedeniyle hücre hattı çalışmaları ön plana çıkmakta ve her geçen gün hücre hatlarıyla daha fazla çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan sitotoksisite testlerinin gelişimine baktığımızda; uyumlu çözücüleri seçmek için birçok girişimde bulunulmuş ve in vitro hücre canlılığı ve çoğalma testinin hem istirahat hem de proliferasyon safhasındaki hücrelerde temel hücresel işlevlere verilen kritik hasarı değerlendirmenin ölçüsü olduğu kabul edilmiştir. İlk defa Mosmann tarafından, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini (MTT testi) ölçmek suretiyle hücre canlılığını ve proliferasyon inhibisyonunu test etmenin ve bileşiklerin hücrelere karşı sitotoksisitesini belirlemenin basit ve hızlı bir yöntemi olduğu tanımlanmıştır (81).

Zapor ve arkadaşları tarafından hepatosit hücre kültüründe suda çözünmeyen organik solventlerden etil benzen, tetrakloroetilen ve n-hekzanın sitotoksisitelerinin MTT testi vasıtasıyla araştırıldığı çalışmada, etil benzenin toksisitesinin diğer iki solvente nazaran daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (82).

Demir ve arkadaşları tarafından etanol ve dimetil sülfoksitin; melanoma (VMM917), akciğer kanseri (A549), kolon kanseri (WiDr), normal kolon (CCD 841 CoN), fibroblast (BJ), insan meme (MCF-7), karaciğer (HepG2) ve serviks (HeLa) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, hücreler farklı konsantrasyonlarda (%0,1; %0,2; %0,4; %0,6; %0,8; %1; %2 ve % 4 v/v) etanol ve DMSO ile muamele edilmiş ve ardından MTT prosedürü uygulanmış; DMSO ve etanole en duyarlı hücreler sırasıyla WiDr ve VMM917 iken, en dirençli hücreler sırasıyla BJ ve A549 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, her bir hücre hattında etanol ve DMSO'nun sitotoksik etki sergilediği konsantrasyon aralığının farklı olduğu ortaya konulmuştur(86). Bu çalışma solventlerle ilgili hücre türüne göre solventin sitotoksisitesinin farklılık gösterebileceği, belirli bir hücre kültüründe çok az sitotoksik etkisi görülen solventin başka bir hücre kültüründe çok daha fazla

sitotoksik olabileceğini göstermektedir. Örneğin Syed ve arkadaşları tarafından, organik solventlerin (asetonitril, aseton, etanol, metanol ve dimetil sülfoksit) konsantrasyona bağlı olarak karaciğer mitokondri hücrelerinde oksidatif fosforilasyona etkilerinin incelendiği çalışmada asetonitril, aseton, etanol, metanol ve dimetil sülfoksit için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri sırasıyla; %2,12 ± 1,04 v/v , %4,39 ± 1,02 v/v, %4,66 ± 1,05 v/v, %8,33 ± 1,04 v/v ve %13,37 ± 1,06 v/v olarak tespit edilerek metanol ve dimetil sülfoksitin daha az inhibitör etki gösterdikleri vurgulanmıştır (84). Bizim çalışmamızda solvent olarak kullandığımız etanol bu çalışma neticesinde karaciğer hücrelerinde toksik etkili olarak bildirilmiş olması neticesinde; solventlerin bir hücre kültüründe çok az toksik etki gösterirken başka bir hücre kültüründe belirgin toksisitesinin olabileceği görülmektedir.

Benzer şekilde Koç ve arkadaşları tarafından organik solventlerden metanol, etanol, dimetil sülfoksit, etil asetat ve asetonun, K562, HL60, HCT-116 ve H929 hücre hatlarının çoğalması üzerine zaman ve konsantrasyona bağlı etkilerinin incelendiği bir çalışmada, diğer solventlere nazaran etil asetatın en az toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada etanolün %5 ve 10'luk konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72. saatlerde söz konusu hücre hatlarında proliferasyonunu azalttığı ve IC_{50} değerlerinin 24, 48 ve 72. saatlerde için K562 hücre hattı için sırasıyla %8,73 ± 0,08, %8,59 ± 0,34, %8,61 ± 0,60, HCT-116 hücre hattı için sırasıyla %8,54± 0,25, %8,037± 0,17, %9,009 ±0,42, HL60 hücre hattı için sırasıyla %9,18± 0,21, %6,88± 0,34, %7,18 ± 0,16, ve H929 hücre hattında 24 ve 48.saatlerde HL60 hücre hattından %10 daha fazla iken 72.saatte %6,31 ± 0,72 olduğu tespit edilmiştir (85). Bu çalışmada bahse konu hücre hatlarında solvent olarak kullanılan etanolün konsantrasyonunun bizim çalışmamıza nazaran 2,5-5 kat fazla olduğu görülmekte, dolayısıyla bahse konu hücre hatlarının etanolün sitotoksisitesine çalışmamızda kullanılan hücre hatlarına göre daha az duyarlı oldukları değerlendirilmektedir.

Jamalzadeh ve arkadaşları tarafından MCF-7, RAW-264.7 ve HUVEC hücre hatları üzerinde yaygın olarak kullanılan solventlerden etanol, aseton, dimetil sülfoksit ve dimetilformamidin toksisitesinin incelendiği bir çalışmada %0,1 ve %0,5

konsantrasyonlarında aseton, etanol ve dimetil sülfoksitin yok sayılacak kadar az toksisiteye neden oldukları gösterilmiştir (86). Nguyen ve arkadaşları tarafından solventlerin sitotoksisitelerinin tespitine yönelik yapılan bir çalışmada etanol ve metanolün HepG2, MDA-MB-231, MCF-7 ve VNBRCA1 hücre hatlarına %1,25-%0,15 konsantrasyonlarında toksik etki göstermedikleri ortaya konulmuştur (87). Solvent seçimi ile ilgili olarak Ilieva ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yaygın olarak kullanılan solventlerden dimetoksietan, 2-metoksi etanol, dimetil sülfoksit, polietilen glikol, dimetilformamid, etanol ve metanolün; 2 non tümoral (CCL-1 ve HaCaT) ve 2 tümoral (A-375 ve A-431) hücre hatları üzerinde toksisiteleri 72 saatlik MTT testi ile incelenmiş ve etanolün hücre hatları üzerinde en az toksik solvent olduğu tespit edilmiştir (88). Dolayısıyla bahse çalışma ile solvent seçimi açısından bizim çalışmamızda da benzer bulgular gözlemlenmiş olup, yaptığımız MTT testi sonrası etanolün %2 üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiş ve PE ile PM ≤%2'lik etanol solüsyonu ile hazırlanmıştır.

Bunun dışında hücre hatlarıyla sitotoksisite testleri için inkübasyon süresi de önem arz etmektedir. Bu maksatla FDA tarafından aksi belirtilmedikçe 37 ^{0}C sıcaklıkta 24-72 saat arasında inkübasyon yapılması önerilmektedir (89).

Paraokson ve diğer organofosforlu bileşiklerle deney hayvanları üzerinde yapılan önemli nörotoksisite çalışmaları incelendiğinde;

Maksimovic ve arkadaşları tarafından paraokson ile zehirlenmede belirtilerin başlangıç hızı ve şiddeti üzerine yapılan bir çalışmada; paraokson stok çözeltisi (100 mg/mL) izopropil alkol içinde çözülerek hazırlanmış, Wistar ratlarına 0,2; 0,3; 0,35 ve 0,4 mg/kg dozlarında paraokson subkutan uygulanmış ve ratlar için paraoksonun LD_{50} değerinin 0,33 mg/kg (SC) olduğu bildirilmiştir (90). Berrios ve arkadaşları tarafından paraoksonun nöral kök hücre farklılaşmasına etkisi hakkında yapılan çalışmada embriyo rat telensefalonundan elde edilen hücre kültürlerinin canlılığında, paraoksonun 50 μM üzerindeki konsantrasyonları ile maruziyet sonrası azalma olduğu ve bu etkinin dozdan bağımsız olduğu bildirilmiştir (91). Wistar ratları ile yapılan benzer bir çalışmada Bahrami ve arkadaşları tarafından bir hafta süreyle 50 μM dozda paraoksona maruz kalan Wistar rat hipokampal hücrelerinde canlılığın

%50 oranında azaldığı bildirilmiştir (92). Organofosforlu bileşiklerin nörotoksisitesinin değerlendirilmesine yönelik Yousefpour ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; Wistar ratlarından elde edilen hipokampal hücreler paraoksona maruz bırakılmış; 10 µM dozunda paraoksona maruz kalan grup ile kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilemezken, 50 µM doza maruz kalan grupta belirgin ultrastrüktürel değişiklikler gözlenmiş ve 100 µM üzerindeki dozlarda nöronal gelişimin olmadığı tespit edilmiştir (93). Farizatto ve arkadaşları tarafından paraoksonun nörotoksisitesi hakkında yapılan bir çalışmada, 12 günlük rat beyinleri disseke edilerek hipokampal bölgeleri 400 µm'lik kesitler halinde hazırlanmış ve 24 saat süreyle 10, 50, 100 ve 200 µM dozunda paraoksona maruz bırakılmıştır. Sadece 200 µM'lık dozda paraoksonun, uygulamadan 24 saat sonra sinaptik azalmaya yol açtığı görülmüş ve presinaptik marker olarak kullanılan sinapsın IIb'nin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (94). Söz konusu çalışmalarda yetişkin ratlara nazaran yenidoğan ratlarda nörotoksisitenin daha yoğun olduğuna vurgu yapılmaktadır. Bu durumun hayatın erken evrelerinde KBB'nin henüz maturasyonunu tamamlamamış olmasından kaynaklandığı muhtemel gözükmektedir. Dolayısıyla yetişkinlerin OP'lara bağlı nörotoksisiteye nispeten daha dayanıklı oldukları değerlendirilebilir.

Organofosforlu bileşiklerin sitotoksisiteleri üzerine yapılan çalışmalarda özellikle son 10 yılda hücre kültürü çalışmalarının ağırlık kazandığı görülmektedir. Paraokson sitotoksisitesi ile ilgili önemli hücre kültür çalışmalarına değinmek gerekirse;

Mirzaei ve arkadaşları tarafından paraoksonun PC12 hücreleri üzerindeki sitotoksisitesinin incelendiği çalışmada, paraokson kullanımının güvenilir bir seçim olduğu özellikle belirtilmektedir. Bu nedenle bizim de çalışmamızda organofosforlu bileşikleri temsilen kullanılan paraokson'un seçiminin yerinde bir seçim olduğu değerlendirilmektedir. Söz konusu çalışmada ayrıca MTT testi sonucunda; paraokson konsantrasyonundaki artışın, PC12 hücrelerinde hücre canlılığının önemli ölçüde azalmasına yol açtığını bildirilmiştir (95). Benzer şekilde Pamies ve arkadaşları tarafından NT-12 hücrelerinden derive edilen nöron benzeri hücrelerde organofosforlu bileşiklerden paraokson ve mipafoks'un etkilerinin incelendiği bir

çalışmada; paration ve metaboliti paraoksonun insanlarda nörotoksisiteye sebep olduğuna vurgu yapılarak; 0,5; 1; 5; 10; 25; 40; 70; 100; 150; 200 ve 300 µM lık paraokson maruziyetinin 4 ve 15. günlerdeki etkileri ile ilgili; 4. günde 200 ve 15. günde 100 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma tespit edildiği bildirilmiştir (96). Bizim çalışmamızda PE ve PM'nin IC_{50} değerlerinin hesaplanması sırasında; SH-SY5Y hücre hattında çok belirgin olmamakla birlikte özellikle BMVEC hücre hattında maruziyet süresi arttıkça IC_{50} değerlerinin düşme eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız SH-SY5Y hücreleri, nörotoksisite testleri için oldukça uygun olduğundan, literatürde bu hücreler ile hem organofosforlu bileşikler hem de diğer birçok ilacın etkilerinin değerlendirildiği oldukça fazla çalışma yer almaktadır. Bunlardan organofosforlu pestisitlerle yapılan çalışmaları incelediğimizde;

Suarez ve arkadaşları tarafından insanlarda organofosfatların nörotoksikolojisini araştırmak için SH-SY5Y hücreleri ile yapılan çalışmalar üzerine yazılan bir derlemede; SH-SY5Y hücrelerinin paration ve metaboliti paraokson, leptofos ve metaboliti leptofos-okson, metil paration ve metaboliti metil paratiyon okson, mono-krotofos, diklorvos, mipafoks ve triklorfon gibi organofosforlu pestisitlerle maruziyeti sonrası esas olarak mitokondriyal bozulma, oksidatif stres ve apoptoz ile ilişkili genel sitotoksisite gösterdikleri belirtilmektedir (97).

Wang ve arkadaşları tarafından paration, paraokson ve bunların metillenmiş derivelerinin rat nöroblastoma hücrelerine sitotoksisitelerinin incelendiği bir çalışmada, dört organofosforlu bileşiğin stok solüsyonlarının dimetil sülfoksit ile hazırlandığı, 24 saat maruziyet sonrası paraokson, metil-paraokson, paration ve metil-parationun IC_{50} değerlerinin sırasıyla 0,42 mM, 0,46 mM, 0,66 mM ve 0,77 mM olarak tespit edildiği ve bu bileşiklerden bizim de çalışmamızda kullandığımız paraokson için hücre canlılığının 0,125 mM konsantrasyonda %94,67 ± 6,22, 0,25 mM konsantrasyonda %66,36 ± 10,88, 0,5 mM konsantrasyonda %37,56 ± 12,12, 1 mM konsantrasyonda %13,07 ± 4,31 ve 2 mM konsantrasyonda %7,40 ± 5,51 olarak ölçüldüğü bildirilmiştir (98). Bu çalışmada elde edilen IC_{50} değerleri bizim bulduğumuz IC_{50} değerleri ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

Bharate ve arkadaşları tarafından paration ve paraoksonun SH-SY5Y hücre hatları üzerindeki etkilerinin mukayese edildiği bir çalışmada, MTT testi ile yapılan ölçümlerde paration ve paraoksonun 50 μM dozlarıyla 48. ve 72.saatlerde sitotoksisitenin gözlemlendiği ve 100 μM doza çıkıldığında ise parationa maruz bırakılan hücrelerde 24. saatte anlamlı bir düşüş olmazken, paraoksonun 24, 48, 72. saatlerde (paraoksonun 24. saatte %90 oranında azalttığı) ve parationun 48, ile 72. saatlerde yapılan ölçümlerde hücre canlılığını en az %60 oranında azalttıkları tespit edilmiştir (99).

Hinojosa ve arkadaşları tarafından SH-SY5Y hücre hatları üzerinde organofosforlu bir pestisit olan klorpirifos ve bir siyanotoksin olan slindrospermopsin kombinasyonun etkilerinin araştırıldığı çalışmada, MTS testi ile klorpirifosun 24. saatte EC_{50} değeri 83,98 ± 2,74 μg/mL olarak ölçülmüş, 21, 42 ve 84 μg/mL dozlarında klorpirifosun 4, 8, 12 ve 24. saatlerde kontrol grubuna kıyasla ROS seviyelerinde belirgin bir artışa yol açmadığı ancak her 3 konsantrasyonun da belirtilen saatlerde yapılan ölçümlerde glutatyon (GSH) düzeylerinde belirgin azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (100).

Carlson ve arkadaşları tarafından organofosforlu bileşiklerin SH-SY5Y hücrelerindeki apoptozis etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, nükleer apoptozisin parationun 1mM'lık dozuyla 960. dakikada ve paraoksonun 1 mM'lık dozuyla 4320. dakikadan görülmeye başlandığı ve her iki bileşiğin 100 μM dozları ile belirgin bir şekilde zamana bağlı nükleer apoptozisin gözlendiği bildirilmiştir (101). Paraoksonun indüklediği apoptozis hakkında çalışmalar yapan bir başka araştırmacı olan Li ve arkadaşları tarafından EL4 (lenfosittik lenfoma) hücrelerinde farklı dozlarda paraokson maruziyeti sonrası 1-10 nM'lık maruziyetlerin doz bağımlı olarak apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (102).

Barber ve arkadaşları SH-SY5Y hücrelerini 28 gün boyunca organofosforlu bileşiklere maruz bıraktıkları çalışma ile organofosforlu bileşiklerin esteraz aktivitelerinin in vitro olarak çalışılıp çalışılamayacağını araştırmışlardır. Çalışmada organofosforlu bileşikler, final konsantrasyonu %0,1 (v/v) olacak şekilde etanol ile çözdürülmüştür. Söz konusu çalışmada paraoksonun nöroblastoma hücrelerindeki AChE inhibisyonuyla ilgili olarak 10^{-9} M doza 28 günlük maruziyet sonrası

inhibisyon oranı %79±8 iken tek bir maruziyet sonrası inhibisyon oranı %41±4 olarak tespit ederek nöroblastoma hücrelerinin organofosforlu bileşiklerin esteraz inhibisyonu hakkında faydalı bilgiler sağlayabileceğini belirtmişlerdir (103).

Forsby ve arkadaşları tarafından in vivo nörotoksisite risk değerlendirmesine yönelik olarak in vitro nörotoksisite testleri üzerinde çalışmış, bu maksatla SH-SY5Y hücreleri, 72 saat boyunca akrilamid, lindan, paration, paraokson, fenitoin, diazepam ve kafeine tek veya tekrarlanan dozlarda maruz bırakılarak en düşük nörotoksik dozlar tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu maksatla paration 0,1; 1; 10; 50; 100; 500; 1000 ve 10 000 µM ve paraokson 0,1; 1; 10; 50; 100; 500; 1000 ve 10 000 µM dozlarında 72 saat süreyle SH-SY5Y hücrelerine uygulanmıştır. Testler sonunda paration ile herhangi bir nörodejeneratif etki göstermezken; paraoksonun genel sitotoksisiteye neden olandan çok daha düşük konsantrasyonlarda nörodejenerasyonu indüklediği ve paraokson kaynaklı nörodejenerasyon için 72 saatlik maruziyetten sonra EC_{20} değerinin, 40 µM olduğu hesaplanmıştır (104).

Charoenying ve arkadaşları tarafından paraoksonun nöronal ve lenfositik kolinerjik etkilerinin incelendiği bir çalışmada; 24 saat maruziyet ile paraoksonun 500 µM dozunda SH-SY5Y hücre hatlarının canlılık oranlarında %19 ve 100 µM dozunda MOLT-3 Lösemik T-lenfosit hücre hattı) hücre hatlarında ise %21 azalma görüldüğü, dolayısıyla paraoksonun sitotoksik etkilerinin MOLT-3 hücrelerinde daha düşük dozlarda ve daha erken ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Ayrıca söz konusu çalışmada, sitotoksisite başladıktan sonra MOLT-3 hücrelerinin canlılığı keskin bir şekilde düşerken, SH-SY5Y hücrelerinde kademeli bir düşüş olduğu gözlenmiştir (105).

Prins ve arkadaşları tarafından paraoksonun SH-SY5Y hücrelerinde protein ekspresyonuna etkileri hakkında yapılan bir çalışmada; %100 asetonitril içinde 10 mM paraokson stok solüsyonu hazırlanmış, SH-SY5Y hücreleri 24, 48 veya 72 saat boyunca 10 nM – 100µM arasında değişen paraokson konsantrasyonlarına maruz bırakılarak MTT testi yapılmıştır. Söz konusu çalışmada 24 saatlik MTT analizi, paraokson maruziyetinin, 10 nM ila 100 µM arasında test edilen konsantrasyon aralığında hücre canlılığında önemli bir azalmaya yol açmadığı, 48 saat ve 72. saatlerde SH-SY5Y hücre canlılığının paraokson konsantrasyonu 10 µM'yi aştığında

kontrolün ≤ %80'ine düştüğü, 96 saatlik maruziyette ise 1 μM kadar düşük dozlarda bile önemli sitotoksisite (kontrolün yaklaşık %70'i) meydana geldiği ve 100 μM paraokson maruziyetinde kontrol hücresi canlılığının yalnızca %5'i kaldığı belirtilerek çalışmanın sonraki aşamalarındaki proteomik çalışmalarda paraoksonun 48. saatte hücre canlılığı eşiğinin altındaki 20 μM'lık dozlarıyla yürütüldüğü bildirilmiştir (106).

Avrupa AcuteTox FP6 konsorsiyumunun bir parçası olarak gerçekleştirilen çalışmalarda KBB modeli olarak KBB endoteli kullanılmış ve 1 saat süreyle 32 bileşiğin denendiği çalışmada 5 bileşiğin (klorheksidin, kolşisin, civa klorid, paration ve sodyum lauril sülfat) 100 μM dozda toksik etkili oldukları tespit edilmiş, daha ileri çalışmalar, bu bileşiklerin bazılarının (örn. paration), nöronal hücre kültürlerinde toksik etkiler üretmeyen konsantrasyonlarda KBB'ne karşı toksik olabileceğini vurgulamıştır (55).

Bilindiği gibi pralidoksim, obidoksim, trimedoksim, metoksim, HI-6 vb. AChE reaktivatörleri, sinir ajanı zehirlenmesinin tedavisi için standart antidotlardır. Oksimlerin KBB boyunca taşınması ve beyin parankimindeki terapötik konsantrasyonları, antidot tedavisinin solunum depresyonu ve sinir ajanı kaynaklı beyin hasarı üzerindeki etkinliğini belirler. Maruziyet sonrası sinir ajanları, lipofilik yapıları nedeniyle KBB'ni geçerek SSS'e ulaşır ve ölüme yol açan solunum depresyonuna neden olurlar (39). Bu nedenle KBB çalışmaları sitotoksisite testleri açısından olduğu kadar ideal bir oksim preparatının sentezi ve santral sinir sistemine geçişinin in vitro olarak denenmesi noktasında hayati önem taşımaktadır. KBB hücreleri ile yapılan çalışmalara değinmek gerekirse;

Ravid ve arkadaşları tarafından KBB'nin organofosfatlı pestisitlere hücresel düzeyde verdiği yanıtlar hakkında yapılan bir çalışmada, organofosfatlı pestisit olarak paraokson kullanılmış ve AChE inhibisyonundan bağımsız olarak KBB fonksiyonundaki değişikliklerin altında yatan hücresel mekanizmalar araştırılmıştır. Bu maksatla 400 mM stok paraokson solüsyonü etanol içinde çözülerek istenilen konsantrasyonlarda KBB hücrelerine eklenmiş, hücrelerin canlılığı 24 saat sonra MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT testinde paraoksonun 300 μM'lık dozu için %20,7 ± 0,6, 600 μM için %40,4 ± 0,5, 900 μM için %46,5 ± 0,7 ve 1200 μM için

%50 ± 0,6'dan başlayarak canlılıkta doza bağlı anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Hücre ölüm ölçeği olarak kullanılan LDH düzeyleriyle yapılan değerlendirmede, 300 μM doz için kontrole kıyasla 1,41 ± 0,04 kat, 600 μM için 2,37 ± 0,05 kat, 900 μM için 2,45 ± 0,07 kat ve 1200 μM için 2,3 ± 0,05 kat olacak şekilde LDH salınımının önemli bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Oksidatif stres belirteci olarak 48 saat süreyle ROS düzeyleri de ölçülmüş, doza bağımlı olarak ROS seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca 900 μM dozundaki paraoksonun maruziyetten 3 saat sonra ROS seviyelerinde belirgin bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (107).

Son olarak organofosforlu bileşiklerin neden olduğu oksidatif hasarın incelenmesi de önemli bir araştırma konusu olduğundan bu konuda gerek oksidatif hasarın değerlendirilmesi ve gerekse bu oksidatif hasardan korunmada etkili ilaçlar üzerine yapılan çalışmalara değinmek gerekirse;

Shieh ve arkadaşları tarafından insan astrosit hücrelerine malationun etkileri üzerinde yapılan çalışmada, 100 mM'lık malation stok solüsyonunun dimetil sülfoksit ile hazırlanmış, WST-1 testi ile hücre canlılığının ölçülmüş ve oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada malationun 10-20 μM dozları ile doz bağımlı olarak hücrelerin canlılığında azalma görüldüğü, 25 μM dozda tüm hücrelerin öldüğü, malationun astrosit hücreleri üzerindeki IC_{50} değerinin 12,5 μM olarak tespit edilmesi nedeniyle sonraki testlerin 10 ve 15 μM'lık malation dozları ile yapıldığı, 24 saat maruziyet ile konsantrasyon bağımlı olarak ROS üretiminde artış ve GPx ile CAT düzeylerinde azalma görüldüğü, 5 μM dozda NAC verilmesi ile 10 μM malation maruz bırakılan hücrelerde 1,4±0,2 kat ve 15 μM malationa maruz bırakılan hücrelerde 2,1±0,2 kat GPx seviyelerinde azalma görüldüğü, CAT seviyelerinde ise sırasıyla 1,4±0,3 ve 1,9 ±0,3 kat azalma görüldüğü bildirilmiştir (108).

Worek ve arkadaşları tarafından organofosforlu pestisitlerin rat akciğerleri üzerindeki hava yolu etkileri, sitotoksiteleri, inflamatuar yanıt ve antioksidan mekanizmalar hakkında yaptıkları bir çalışmada; malation, malaokson, paration ve paraoksonun 100–2000 μmol/L'lık dozları asetonitril ile çözdürülerek kullanılmış, akciğer kesitlerinin canlılığı Alamar Blue testi, LDH düzeyi ve tüm protein içerik miktar tayini ile 24 saatlik maruziyet sonrası değerlendirilmiş ve 24 saatin sonunda

1200 µmol/L paraokson (%63 ± 5), 600 µmol/L malaokson (%59 ± 14) ve 1000 µmol/L malationda (%63 ± 14) belirgin değişiklikler gözlenirken parationda böyle bir değişiklik tespit edilmemiştir. Buradan EC_{50} konsantrasyonları paraokson için ~ 1400 µmol/L, malaokson için ~ 600 µmol/L ve malation için ~ 1100 µmol/L olarak hesaplanmış ayrıca ≥ 1400 µmol/L malaoksona maruziyette tam bir canlılık kaybı gözlenmiştir. Oksidatif stres testlerinden intraselüler GSH düzeylerinde 1500 µmol/L dozunda 8. saatin sonunda paraokson ile %17 ± 1; paration ile %49 ± 4; malaokson ile %30 ± 6 ve malation ile %51 ± 16 azalma olduğu, intraselüler GSSG düzeylerinde ise aynı dozda paraoksonda %44 ± 5 düzeyinde belirgin bir azalma olurken paration ve malationda kontrole göre belirgin bir farklılık olmadığı, malaoksonda ise %320 ± 28 düzeyinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 5 mmol/L dozunda NAC ilavesi ile paraokson ve maloksonun hücre canlılığı üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda paraokson için istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olmadığı, malaokson için 1000 µmol/L dozunda hücre canlılığının NAC'sız %63 ± 9, NAC ile 91 ± 4 olduğu, 1500 µmol/L dozunda NAC'sız %11 ± 2, NAC ile %65 ± 9 olduğu ve 2000 µmol/L dozunda ise NAC'sız 4 ± 1, NAC ile %37 ± 9 olduğu tespit edilmiştir (109).

Benzer bir çalışma yakın zamanda Saroj ve arkadaşları tarafından etil-parationun SH-SY5Y hücreleri üzerindeki nörotoksik etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır. Söz konusu çalışmada, SH-SY5Y hücreleri 30 dakika süreyle 0,5; 2,5; 5; 10 ve 25 µg/ml etil-parationa maruz bırakılarak hücre canlılık oranları incelenmiş, sonraki testlerde subletal toksisite için 0,5 ve belirgin letal toksisite için 10 µg/ml etil-paration kullanılmasına karar verilmiştir. Bu dozlarda DCF floresans yoğunluğu ile ölçülen yoğun ROS üretiminin, 10 µg/ml etil-paration ve 100 µg/ml NAC birlikte tatbik edilmesiyle belirgin şekilde azaldığı bildirilmiştir (110).

İnsan akciğer hücre kültürü ile bir çalışma da Angelini ve arkadaşları tarafından yapılmış, ajanların stok solüsyonu bizim çalışmamızda olduğu gibi etanol ile hazırlandıktan sonra, hücreler 24 saat süreyle 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 5 ve 10 mmol/L dozlarında paration, paraokson, malation ve maloksona maruz bırakılmış, hücresel sitotoksisite LDH düzeyleri ile takip edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı LDH artışının paraoksonun 1 mmol/L ve üzerindeki dozlarında gerçekleştiği ve

paraoksonun IC_{50} değerinin yaklaşık olarak 0,5 mmol/L olarak tespit edildiği bildirilmiştir (111). Bu çalışmadan elde edilen IC_{50} değeri de bizim çalışmamızla örtüşmektedir.

Zepeda-Arce ve arkadaşları tarafından organofosfat ve pretrioid pestisitlere maruz kalanlarda oksidatif stres ve DNA hasarının belirlenmesine yönelik bir çalışmada, işçiler hiç maruz kalmayan, orta derecede maruz kalan ve yoğun şekilde maruz kalanlar olarak üç gruba ayrılmış; CAT (referans grup: 92,9 U/g Hb, yüksek maruziyet grubu: 59,9 U/g Hb) GPx (referans grup: 215,2 U/mL, yüksek maruziyet grubu: 188,3 U/mL) ve SOD (referans grup: 111,9 U/mL, yüksek maruziyet grubu: 91,7 U/mL) antioksidan enzim aktivitelerinin, referans grubuna göre yüksek maruziyet grubunda ciddi bir farklılık olduğu gösterilmiştir (112).

Weis ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada organofosforlu pestisitlerden klorpirifosun müren mikroglial hücreleri (BV-2 hücreleri) üzerine uygulanmasının nöroinflamasyona yol açıp açmadığı araştırılmış, bu maksatla BV-2 hücreleri 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 ve 300 μM dozlarda klorpirifosa 96 saat süreyle maruz bırakılmış, 30-300 μM dozlarda klorpirifosun hücre canlılığını azalttığı, 300 μM dozda ROS üretiminde belirgin artış görüldüğü, 1, 3, 10 μM dozlarda süperoksit anyonu seviyelerinde artış görüldüğü bildirilmiş ve sonuç olarak klorpirifosun oksidatif stresi arttırdığı ve çok düşük konsantrasyonlarda klorpirifos maruziyetinin dahi, mikroglial hücrelerde pro-oksidatif ve pro-inflamatuar durumları arttırarak etki ettiği belirtilmiştir (113).

Dhillon ve arkadaşları tarafından organofosforlu bir insektisit olan monokrotofosun erkek albino wistar ratların beyinlerinde indüklediği oksidatif stres karşısında NAC etkinliğinin incelendiği çalışmada; ratlar kontrol, sadece NAC, sadece MCP ve NAC+MCP olmak üzere 4 gruba ayrılmış, ratlar 0,9 mg/kg dozunda MCP ve 200 mg/kg dozunda NAC olacak şekilde 28 gün maruz bırakılmış, ratların frontal korteks, korpus striatum ve hipokampus beyin bölgelerinde NAC'in antioksidan yanıtı geliştirerek, nöroprotektif etki sağladığı bildirilmiştir (114). Elde edilen sonuçlar çalışmamızın bulguları ile uyumludur.

6. SONUÇLAR

Merkezi sinir sistemi dokuları KBB fonksiyonu sayesinde organofosforlu bileşiklere karşı belirli bir seviyeye karşı korunur iken bu bariyerin kimyasal ajana maruz kalması sonucu artan permeabilite; kalsiyum akışının artışının tetiklediği mekanizmalarla aynı dozda diğer organlara nazaran beyinde çok daha fazla hasara neden olabilmektedir. Diğer taraftan beyin dokusunda diğer organlara kıyasla poliansatüre yağ asitleri daha fazla yer aldığından, peroksidasyon reaksiyonları gerçekleşmekte dolayısıyla oksidatif denge süratle bozulmaktadır.

Tsai ve arkadaşları tarafından organofosfat nörotoksisitesinin mekanizmalarının ortaya konulması maksadıyla yakın zamanda yapılan çalışmaların gözden geçirildiği çalışmada; OP'lerin, maruz kalma şekline bağlı olarak değişen çoklu mekanizmalar yoluyla nörotoksisiteye neden olduğu ve hem akut yüksek seviyeli hem de tekrarlayan düşük seviyeli OP maruziyetinde oksidatif stresin nörotoksisite için ana mekanizma olduğu belirtilmiştir (115).

Organizmamızda oksidasyon süreci doğal olarak da meydana gelmekte, oksidan ve antioksidanlar arasında denge yani oksidatif denge ilave bir oksidatif yük olmadıkça kolaylıkla sağlanabilmektedir. 2'nci bölümde değindiğimiz antioksidanların her biri spesifik reaksiyonlarda rol almakta ve aslında birbirlerini tamamlamaktadır. Çalışmamızda oksidatif stres durumunu belirlemek için kullandığımız GPx; GSH'u kullanarak GSSG'a dönüşmektedir. Glutatyon redüktaz enzimi ise GSSG'yi tekrar GSH'a dönüştürerek GSH düzeyini stabil hale getirmeye çalışmaktadır. NAC da organizmada sülfidril grubu kaynağı görevi üstlenerek glutatyon düzeylerinin artmasını dolayısıyla oksidatif dengenin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda organofosforlu pestisitlerden paraoksonun nöroblastoma ve kan beyin bariyeri hücre hatları üzerindeki sitotoksisitesi, oksidatif stres düzeyi yanı sıra bu etkilerinden korunmada NAC molekülünün etkinliği araştırılmıştır.

Organofosforlu pestisitlere bağlı intoksikasyon tabloları konuyla ilgili düzenlemelere rağmen görülmeye devam etmektedir. Bu çalışmada da ana hatları

çizilen organofosforlu pestisitlere bağlı zehirlenmelerde; oksidatif hasar kolinerjik tablodan çok daha hayati önem arz etmektedir. Üstelik oksidatif hasar subakut dozlarla yani hiçbir klinik belirti olmayan durumlarda da ortaya çıkabilmektedir. Dolayısıyla klinisyenler tarafından bu vakalarda hatta mesleki maruziyetlerin araştırıldığı durumlarda mutlaka oksidatif denge durumun da değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle oksidatif dengeyi; etkilenen yaralılar lehine değiştirecek olan NAC molekülünün standart tedavi protokollerine eklenmesinin sağlayacağı faydaya yönelik ileri seviye çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Malathionun, Rat Serumunda Oksidan Ve Antioksidan Sistem, İnflamatuar Belirteçler Ve Bazı Metabolik Biyomoleküller Üzerine Etkilerinin İncelenmesi | AVESİS [Internet]. [erişim tarihi: 01 Ekim 2022]. Available at: https://avesis.gazi.edu.tr/yonetilen-tez/678d5735-745c-4cac-8a4f-62ed3b991ab5/malathionun-rat-serumunda-oksidan-ve-antioksidan-sistem-inflamatuar-belirtecler-ve-bazi-metabolik-biyomolekuller-uzerine-etkilerinin-incelenmesi
2. Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. Hum Exp Toxicol. Eylül 2011;30(9):1119–40.
3. Boedeker W, Watts M, Clausing P, Marquez E. The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. BMC Public Heal 2020 201. 07 Aralık 2020;20(1):1–19.
4. Robb EL, Baker MB. Organophosphate Toxicity [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2022 [erişim tarihi: 01 Ekim 2022]. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/
5. Pesticide residues in food [Internet]. [erişim tarihi: 01 Ekim 2022]. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food
6. Hill C.J., Smart J.K., Hill B, History of Chemical Warfare. Içinde: Medical Aspects of Chemical Warfare. 2nd Edition. Washington: TMM Publications; 2008. s. 10–1.
7. Robinson JP (SIPRI). The Rise in CB Weapons. In: The Problem Of Chemical And Biological Warfare. 1st Ed. Neild R, editör. Stocholm: Humanities Press Inc.; 1971. 123 s.
8. Salem, Harry, Ternay, Andrew L., Smart JK. Brief History and Use of Chemical Warfare Agents in Warfare and Terrorism. Içinde: Romano, James A., Lukey, Brian J., Salem H, editör. Chemical Warfare Agents. SEcond. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group; 2008. s. 2–17.
9. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. Toxicology. 30 Ekim 2005;214(3):167–81.
10. Sbacchi A. Poison Gas and Atrocities in the Italo-Ethiopian War (1935–1936). Ital Colon. 2005;47–56.
11. Friedrich B, Hoffmann D, Renn J, Schmaltz F, Wolf M. One hundred years of chemical warfare: Research, deployment, consequences. One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences. Springer International Publishing; 2017. 1–408 s.

12. Bhopal disaster | Causes, Effects, Facts, & History | Britannica [Internet]. [erişim tarihi: 05 Eylül 2022]. Available at: https://www.britannica.com/event/Bhopal-disaster

13. Hrvat NM, Kovarik Z. Counteracting Poisoning with Chemical Warfare Nerve Agents. Arch Ind Hyg Toxicol. 01 Aralık 2020;71(4):266.

14. Tu AT. TOXICOLOGICAL AND CHEMICAL ASPECTS OF SARIN TERRORISM IN JAPAN IN 1994 AND 1995. http://dx.doi.org/101080/15569540701496321. Temmuz 2008;26(3):231–74.

15. Weir E. Public Health: Dioxin contamination and poisoning. C Can Med Assoc J. 03 Mart 2005;172(7):873.

16. Franjesevic AJ, Sillart SB, Beck JM, Vyas S, Callam CS, Hadad CM. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. Chemistry. 04 Nisan 2019;25(21):5337.

17. Tu AT. The use of VX as a terrorist agent: action by Aum Shinrikyo of Japan and the death of Kim Jong-Nam in Malaysia: four case studies. https://doi.org/101080/2377949720201801352. 01 Ocak 2020;5(1):48–56.

18. Ishtiaq M, Talukder A. Sergei Skripal: A Study of the Covert Operation to Assassinate the Russian Double Agent. OPUS Uluslararası Toplum Araştırmaları Derg. 15 Haziran 2021;17(38):5525–44.

19. 2018 Amesbury zehirlenmeleri - Wikipedia [Internet]. [erişim tarihi: 04 Eylül 2022]. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/2018_Amesbury_poisonings

20. Zehirlenen Rus muhalif Navalny'nin ikinci kez öldürülmeye çalışıldığı iddia edildi - Son Dakika Dünya Haberleri | NTV Haber [Internet]. [erişim tarihi: 04 Eylül 2022]. Available at: https://www.ntv.com.tr/dunya/zehirlenen-rus-muhalif-navalni-ikinci-kez-oldurulmeye-calisildigi-iddia-edildi,kk74A7bWlU6ldd4JrhwvxA

21. Karayılanoğlu T, Saygı Ş, Kenar L, Baykal B, Kimyasal Atakta Tıbbi Savunma ve Pestisitler. GATA Basımevi.; 2003. 1–3 s.

22. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and guidelines to classification, 2019 edition [Internet]. [erişim tarihi: 21 Eylül 2022]. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662

23. Physostigmra venenosum B, By THOMAS FRASER BR, Assistant F. On the Physiological Action of the Calabar Bean. J Anat Physiol. 1867;1(2):323.

24. Petroianu GA. Synthesis of tetraethyl pyrophosphate (TEPP): From physician Abbot and pharmacist Riegel to chemist Nylen. Pharmazie. 01 Haziran 2015;70(6):427–34.

25. Aroniadou-Anderjaska V, Apland JP, Figueiredo TH, De Araujo Furtado M, Braga MF. Acetylcholinesterase inhibitors (nerve agents) as weapons of mass destruction: History, mechanisms of action, and medical countermeasures. Neuropharmacology. 15 Aralık 2020;181:108298.

26. Sidell, Frederick R., Newmark Jonathan MJH. Nerve Agents. Içinde: Tuorinsky Shirley D., Redding Joan, Lindsay Ronda, Mason Vivian, Metzgar

Marcia, Wise douglas MB, editör. Medical Aspects of Chemical Warfare. 2nd Edition. Washington: TMM Publications; 2008. s. 156–220.

27. Marrs, Thimoty C., Maynard, Robert L., Sidell FR. CHEMICAL WARFARE AGENTS TOXICOLOGY AND TREATMENT. 2nd Editio. Marrs, Thimoty C., Maynard, Robert L., Sidell FR, editör. West Sussex: Wiley; 2007. 191–249 s.

28. Balali-Mood, Rice P, Willems J, Mathews R, James R, Pita R, "Kimyasal Savaş Yaralılarının Tıbbi Yönetimi İçin Pratik Rehber." Kenar L, Sezigen S, editör. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW); 2017. 147 s.

29. Koolman J, Röhm K-H. Color Atlas of Biochemistry. 3rd editio. Renkli Biyokimya Atlası. Palme Yayınları; 2016. 364–366 s.

30. Aboughazala LM, Anan FM. Al-Azhar University Journal for Virus Research and Studies Study on Serum Cholinesterase as Marker of Chronic Liver Disease. J Res Stud. 2020;2(1).

31. Harvey RA. Lippincott Farmakoloji | Farmakoloji Kitapları. 3rd edition. Nobel Tıp Kitabevleri; 2016. 47–48 s.

32. Long JZ, Cravatt BF. The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. Chem Rev. 10 Ekim 2011;111(10):6022.

33. Wiesner J, Kříz Z, Kuca K, Jun D, Koca J. Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences. J Enzyme Inhib Med Chem. Ağustos 2007;22(4):417–24.

34. English BA, Webster AA. Acetylcholinesterase and its Inhibitors. Içinde: Primer on the Autonomic Nervous System. Academic Press; 2012. s. 631–3.

35. Zhuang Q, Young A, Callam CS, McElroy CA, Ekici ÖD, Yoder RJ, vd. Efforts towards treatments against aging of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase. Ann N Y Acad Sci. 2016;1374(1):94.

36. Senanayake N, de Silva HJ, Karalliedde L. A Scale to Assess Severity in Organophosphorus Intoxication: POP Scale. http://dx.doi.org/101177/0960327 19301200407. 02 Temmuz 2016;12(4):297–9.

37. Yılmaz M, Sebe A, Ay MO, Gürger M. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi Archives Medical Review Journal Organophosphate Poisoning and Intermediate Syndrome. Arşiv Kaynak Tarama Derg. 2015;25(1):70–83.

38. Willis K, Salem H, Sidell FR. Cyclosarin (GF). Içinde: Encyclopedia of Toxicology: Third Edition. Academic Press; 2014. s. 726–30.

39. Sezigen S, Esim O, Sarper M, Savaser A. In vitro evaluation of two different types of obidoxime-loaded nanoparticles for cytotoxicity and blood-brain barrier transport. Toxicol Lett. 15 Eylül 2020;330:53–8.

40. Soltaninejad K AM. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review - PubMed [Internet]. Med Sci. Monit. 2009 [erişim tarihi: 12 Eylül 2022]. s. 75–90. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih. gov/19247260/

41. Gultekin F, Ozturk M, Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). Arch Toxicol. 2000;74(9):533–8.

42. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology. 15 Aralık 1995;104(1–3):129–40.

43. Bachowski S, Xu Y, Stevenson DE, Walborg EF, Klaunig JE. Role of oxidative stress in the selective toxicity of dieldrin in the mouse liver. Toxicol Appl Pharmacol. 1998;150(2):301–9.

44. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol. 1993;23(1):21–48.

45. Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Kasım 2004;287(5).

46. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radic Biol Med. 15 Ağustos 2009;47(4):344–56.

47. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yildiz M, Öztürk A, Çetin M, vd. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). SDU Med Fac J. 01 Eylül 2019;26(3):362–9.

48. Ayten B. Vasküler endotelyal büyüme faktörünün yara iyileşmesi ve oksidatif stres üzerine etkileri | AVESİS. 2013.

49. Rambabu L, Megson IL, Eddleston M. Does oxidative stress contribute to toxicity in acute organophosphorus poisoning? - a systematic review of the evidence. Clin Toxicol (Phila). 02 Haziran 2020;58(6):437–52.

50. DR K. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. Indian J Pharmacol. 2004;36(2):76.

51. Mishra B., Badade Z.G., Rastogi S.K. SS. Antioxidant status and oxidative stress in organophosphate pesticide poisoning. IOSR J Dent Med Sci e-ISSN. 7(6):20–4.

52. Pore NE, Pujari KN, Jadkar SP. Oxidative Stress Markers in Patients with Organophosphorus Poisoning. Int J Biotechnol Biochem. 2018;14(1):59–64.

53. Golomb BA, Devaraj S, Messner AK, Koslik HJ, Han JH, Yik B. Lower blood malondialdehyde is associated with past pesticide exposure: findings in Gulf War illness and healthy controls. Mil Med Res. 01 Aralık 2021;8(1):46.

54. Gültürk S, Bariyeri K-B, Ýmir G. DERLEMELER (Review Articles) The Blood-Brain Barrier Ersin Tuncer. Erciyes Med Journal). 2007;29(2):147–54.

55. Fabulas-Da Costa A, Landry C, Dehouck L, Sevin E, Dehouck M-P, Cecchelli R, vd. Blood–Brain Barrier In Vitro Models and Their Applications in Toxicology. 2014;147–66.

56. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Mol Neurodegener. 24 Ocak 2017;12(1):1–11.

57. Strother L, Miles GB, Holiday AR, Cheng Y, Doherty GH. Long-term culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells in the absence of neurotrophins: A novel model of neuronal ageing. J Neurosci Methods. 01 Ekim 2021;362:109301.

58. Mota LC, Hernandez JP, Baldwin WS. Constitutive Androgen Receptor-Null Mice Are Sensitive to the Toxic Effects of Parathion: Association with Reduced Cytochrome P450-Mediated Parathion Metabolism. Drug Metab Dispos. Eylül 2010;38(9):1582.

59. Deshpande LS, Carter DS, Phillips KF, Blair RE, DeLorenzo RJ. Development of status epilepticus, sustained calcium elevations and neuronal injury in a rat survival model of lethal paraoxon intoxication. Neurotoxicology. 2014;44:17.

60. Deshpande LS, Phillips K, Huang B, DeLorenzo RJ. Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. Neurotoxicology. 01 Eylül 2014;0:352.

61. Farizatto KLG, Bahr BA. Paraoxon: An Anticholinesterase That Triggers an Excitotoxic Cascade of Oxidative Stress, Adhesion Responses, and Synaptic Compromise. Eur Sci J. 15 Kasım 2017;13:29.

62. Pohanka M, Drtinova L, Kuca K. Acetylcholinesterase based assay of eleven organophosphorus pesticides: finding of assay limitations. http://dx.doi.org/101080/03067310903199526. Ocak 2011;92(1):125–32.

63. Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. Cerebellum. 2007;6(4):308–14.

64. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(8):4117–29.

65. Bulut S, Kronik organofosfat intoksikasyonu oluşturulan ratlarda N-Asetil Sisteinin arka kök ganglion hücrelerinde kalsiyum sinyali ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırılması. 06 Ağustos 2011; https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500. 12812/272308

66. Koçkar MC, Naziroğlu M, Çelik Ö, Tola HT, Bayram D, Koyu A. N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and antioxidant vitamin concentrations in liver of rats. Cell Biochem Funct. Aralık 2010;28(8):673–7.

67. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE, Atay ÖA, Doral MN, Salman MA, vd. Effect of low-dose N-acetyl-cysteine infusion on tourniquet-induced ischaemia-reperfusion injury in arthroscopic knee surgery. Acta Anaesthesiol Scand. 01 Temmuz 2005;49(6):847–51.

68. Atılgan F.Ahmet, "N-asetil sisteinin deneysel malathion uygulanan sıçan böbrek ve karaciğer dokularında transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanallarına etkileri" Ulusal Tez Merkezi | Anasayfa [Internet]. [erişim tarihi: 02 Ekim 2022]. Available at:

https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=8Y3uJXJ KKK d5wRk7PgMNCg&no=k_VNK0432tHCODuKxybX7Q

69. Mokhtari V, Afsharian P, Shahhoseini M, Kalantar SM, Moini A. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. Cell J. 2017;19(1):11.

70. Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, vd. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. Hepatol Res. Mart 2006;34(3):199–206.

71. Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJM, Van Oirschot JFLM, Van Der Bruggen T, Van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157(4 Pt 1):1283–93.

72. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci. 01 Ocak 2003;60(1):6–20.

73. Sener G, Tosun O, Şehirli AÖ, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, vd. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Sci. 02 Mayıs 2003;72(24):2707–18.

74. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. Methods Mol Biol. 2011;740:33–43.

75. Moodley K, Angel CE, Glass M, Graham ES. Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. J Neurosci Methods. 15 Eylül 2011;200(2):173–80.

76. Kramer AH, Joos-Vandewalle J, Edkins AL, Frost CL, Prinsloo E. Real-time monitoring of 3T3-L1 preadipocyte differentiation using a commercially available electric cell-substrate impedance sensor system. Biochem Biophys Res Commun. 24 Ocak 2014;443(4):1245–50.

77. Kustermann S, Boess F, Buness A, Schmitz M, Watzele M, Weiser T, vd. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. Toxicol In Vitro. Ağustos 2013;27(5):1589–95.

78. Tampa M, Matei C, Caruntu C, Poteca T, Mihaila D, Paunescu C ve arkadaşları Cellular impedance measurement – Novel method for in vitro investigation of drug efficacy FARMACIA, 2016, Vol. 64, 3. Available at: https://www.researchgate.net/ publication/304495645_Cellular_impedance_ measurement _-_ Novel_method_for_in_ vitro_ investigation_of_drug_efficacy

79. Eddleston M. Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 06 Ocak 2019;59:341–60.

80. Timm M, Saaby L, Moesby L, Hansen EW. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. Cytotechnology. Ekim 2013;65(5):887–94.

81. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 16 Aralık 1983;65(1–2):55–63.

82. Zapór L, Skowroń J, Gołofit-Szymczak M. The cytotoxicity of some organic solvents on isolated hepatocytes in monolayer culture. Int J Occup Saf Ergon. 2002;8(1):121–9.

83. Ayazoglu Demir E, Demir S, Aliyazicioglu Y. Etanol ve Dimetil Sülfoksidin Çeşitli İnsan Hücre Hatları Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisi. 2020 KSU J Agric Nat. 2020;23(5):1119–24.

84. Syed M, Skonberg C, Hansen SH. Effect of some organic solvents on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria: Choice of organic solvents. Toxicol Vitr. 01 Aralık 2013;27(8):2135–41.

85. Koc A, Karabay AZ, Ozkan T, Buyukbingol Z, Aktan F. Time and Concentration Dependent Effects of Different Solvents on Proliferation of K562, HL60, HCT-116 and H929 Cell Lines. J Res Pharm. 2022;26(3):494–501.

86. Jamalzadeh L, Ghafoori H, Sariri R, Rabuti H, Nasirzade J, Hasani H, vd. Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Avicenna J Med Biochem. 30 Nisan 2016;4(1):10–33453.

87. Truong Nguyen S, Chi Minh City H, Thi-Lam Nguyen H, Dinh Truong K. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. Biomed Res Ther. 29 Temmuz 2020;7(7):3855–9.

88. Ilieva Y, Dimitrova L, Zaharieva MM, Kaleva M, Alov P, Tsakovska I, vd. Cytotoxicity and Microbicidal Activity of Commonly Used Organic Solvents: A Comparative Study and Application to a Standardized Extract from Vaccinium macrocarpon. Toxics. 01 Mayıs 2021;9(5).

89. Cber C. Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices-Part 1: Evaluation and testing within a risk management process" Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Preface Public Comment.

90. Maksimović ŽM, Duka D, Bednarčuk N, Škrbić R, Stojiljković MP. Onset rate and intensity of signs of organophosphate poisoning related to paraoxon dose and survival in rats. Scr Med (Brno). 2021;52(1):49–58.

91. Berríos VO, Boukli NM, Rodriguez JW, Negraes PD, Schwindt TT, Trujillo CA, vd. Paraoxon and Pyridostigmine Interfere with Neural Stem Cell Differentiation. Neurochem Res. 01 Ekim 2015;40(10):2091–101.

92. Bahrami F, Yousefpour M, Mehrani H, Golmanesh L, Sadraee SH, Khoshbaten A, vd. Type of cell death and the role of acetylcholinesterase activity in neurotoxicity induced by paraoxon in cultured rat hippocampal neurons. Acta Biol Hung. 14 Mart 2009;60(1):1–13.

93. Yousefpour M, Bahrami F, Shahsavan Behboodi B, Khoshbaten A, Asgari A. Paraoxon-induced ultrastructural growth changes of rat cultured hippocampal cells in neurobasal/B27. Toxicology. 16 Ocak 2006;217(2–3):221–7.

94. Farizatto KLG, McEwan SA, Naidoo V, Nikas SP, Shukla VG, Almeida MF, vd. Inhibitor of Endocannabinoid Deactivation Protects Against In Vitro and In Vivo Neurotoxic Effects of Paraoxon. J Mol Neurosci. 01 Eylül 2017;63(1):115–22.

95. Mirzaei M, Mirzaei M, Tebyanian H, Izadpanah S, Moradi RS, Panahi MRS, vd. Investigation of Paraxon-induced PC12 cells viability, cytotoxicity, and apoptosis in the presence of recombinant butyrylcholinesterase (BCHE). J Environ Treat Tech. 27 Haziran 2021;9(4):714–9.

96. Pamies D, Sogorb MA, Fabbri M, Gribaldo L, Collotta A, Scelfo B, vd. Genomic and Phenotypic Alterations of the Neuronal-Like Cells Derived from Human Embryonal Carcinoma Stem Cells (NT2) Caused by Exposure to Organophosphorus Compounds Paraoxon and Mipafox. Int J Mol Sci. 2014;15(1):905.

97. Lopez-Suarez L, Awabdh S Al, Coumoul X, Chauvet C. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. Neurotoxicology. 01 Eylül 2022;92:131–55.

98. Wang Y, Kim B, Walker A, Williams S, Meeks A, Lee Y-J, vd. Cytotoxic effects of parathion, paraoxon, and their methylated derivatives on a mouse neuroblastoma cell line NB41A3. Fundam Toxicol Sci. 12 Mart 2019;6(2):45–56.

99. Bharate SB, Prins JM, George KM, Thompson CM. Thionate versus Oxon: A Comparison of Stability, Uptake, and Cell Toxicity of (14CH3O)2-Labeled Methyl Parathion and Methyl Paraoxon with SH-SY5Y Cells. J Agric Food Chem. 07 Temmuz 2010;58(14):8460.

100. Hinojosa MG, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Moreno FJ, Cameán AM, Jos A. In vitro assessment of the combination of cylindrospermopsin and the organophosphate chlorpyrifos on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Ecotoxicol Environ Saf. 15 Mart 2020;191.

101. Carlson K, Jortner BS, Ehrich M. Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Toxicol Appl Pharmacol. 15 Ekim 2000;168(2):102–13.

102. Li L, Cao Z, Jia P, Wang Z. Calcium signals and caspase-12 participated in paraoxon-induced apoptosis in EL4 cells. Toxicol Vitr. 01 Nisan 2010;24(3):728–36.

103. Barber DS, Ehrich M. Esterase inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells following exposure to organophosphorus compounds for 28 days. In Vitr Mol Toxicol. 2001;14(2):129–35.

104. Forsby A, Blaauboer B. Integration of in vitro neurotoxicity data with biokinetic modelling for the estimation of in vivo neurotoxicity. Hum Exp Toxicol. Nisan 2007;26(4):333–8.

105. Charoenying T, Suriyo T, Thiantanawat A, Chaiyaroj SC, Parkpian P, Satayavivad J. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. Environ Toxicol Pharmacol. Ocak 2011;31(1):119–28.

106. Prins JM, George KM, Thompson CM. Paraoxon-induced protein expression changes to SH-SY5Y cells. Chem Res Toxicol. 15 Kasım 2010;23(11):1656–62.

107. Ravid O, Elhaik Goldman S, Macheto D, Bresler Y, De Oliveira RI, Liraz-Zaltsman S, vd. Blood-Brain Barrier Cellular Responses Toward Organophosphates: Natural Compensatory Processes and Exogenous Interventions to Rescue Barrier Properties. Front Cell Neurosci. 16 Ekim 2018;12.

108. Shieh P, Jan CR, Liang WZ. The protective effects of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) against oxidative stress-associated apoptosis evoked by the organophosphorus insecticide malathion in normal human astrocytes. Toxicology. 01 Nisan 2019;417:1–14.

109. Tigges J, Worek F, Thiermann H, Wille T. Organophosphorus pesticides exhibit compound specific effects in rat precision-cut lung slices (PCLS): mechanisms involved in airway response, cytotoxicity, inflammatory activation and antioxidative defense. Arch Toxicol. 01 Ocak 2022;96(1):321–34.

110. Amar SK, Donohue KB, Gust KA. Cellular and molecular responses to ethyl-parathion in undifferentiated SH-SY5Y cells provide neurotoxicity pathway indicators for organophosphorus impacts. Toxicol Sci. 02 Aralık 2022;

111. Angelini DJ, Moyer RA, Cole S, Willis KL, Oyler J, Dorsey RM, vd. The Pesticide Metabolites Paraoxon and Malaoxon Induce Cellular Death by Different Mechanisms in Cultured Human Pulmonary Cells. Int J Toxicol. 2015;34(5):433–41.

112. Zepeda-Arce R, Rojas-García AE, Benitez-Trinidad A, Herrera-Moreno JF, Medina-Díaz IM, Barrón-Vivanco BS, vd. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. Environ Toxicol. 01 Haziran 2017;32(6):1754–64.

113. Weis GCC, Assmann CE, Mostardeiro VB, Alves A de O, da Rosa JR, Pillat MM, vd. Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases inflammatory states in BV-2 microglial cells: A role in neuroinflammation. Chemosphere. 01 Eylül 2021;278.

114. Dhillon T, Kumar A, Kumar V. Neuroprotective Effect of N-acetylcysteine Against Monocrotophos-Induced Oxidative Stress in Different Brain Regions of Rats. Appl Biochem Biotechnol 2022 1949. 19 Mayıs 2022;194(9):4049–65.

115. Tsai YH, Lein PJ. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. Curr Opin Toxicol. 01 Haziran 2021;26:49–60.

8. EKLER

Bura

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Savunma Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
Tıbbi K B R N (Kimyasal Biyolojik Radyasyon ve Nükleer)
Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı :E-95710669-100--35832
Konu :Tez Konusu Önerme Formu (Burak Demirbağ)

DAĞITIM YERLERİNE

Üniversitemiz Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü "Tıbbi KBRN" doktora programı öğrencisi Burak DEMİRBAĞ'ın mevcut tez konusunun; malzeme tedarik sürecinde yaşanılan kısıtlamalar nedeniyle değiştirilmesinin uygun olduğu değerlendirilmiştir.

Söz konusu personele ait form EK'te sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. Levent KENAR
Anabilim Dalı Başkanı

Ek:Tez Konusu Önerme Formu

Dağıtım:
Gereği:
Öğrenci İşleri Birimine

Bilgi:
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

T.C.
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü
ANKARA

TEZ KONUSU ÖNERME FORMU

24 / Mayıs / 2021

I- ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

NUMARASI : 170602036

ADI, SOYADI : Burak Demirbağ

ANABİLİM DALI : Tıbbi KBRN

DANIŞMANI : Doç. Dr. Sermet Sezigen

PROGRAMI : ☐ TEZLİ YÜKSEK LİSANS ☐ LİSANS SONRASI DOKTORA ☒ DOKTORA

II- TEZ BİLGİLERİ

TEZİN ADI : Organofosfat metabolitlerinin insan hücre kültürlerinde nörotoksisitesinin değerlendirilmesi

TEZİN İNGİLİZCE ADI : Neurotoxicity Assessment of Organophosphate Metabolites on Human Cell Cultures

ANAHTAR KELİMELER : Organofosfatlar, Metabolit, Hücre Kültürü, Nörotoksisite, Oksidatif Stres

KEYWORDS : Organophosphates, Metabolites, Cell Culture, Neurotoxicity, Oxidative Stress

TEZ ÇALIŞMASINI DESTEKLEYEN KURUM YA DA KURULUŞLAR : Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP

ÖĞRENCİNİN DERS DÖNEMİNDE ALDIĞI TOPLAM AKTS KREDİSİ: 394

Öğrenci	1. Danışman	2. Danışman (varsa)	Anabilim Dalı Başkanı
Burak Demirbağ	Doç. Dr. Sermet Sezigen		Prof. Dr. Levent KENAR

EK 1: TRANSKRİPT BELGESİ (Doktora öğrencileri bu belgeyi vermeyeceklerdir.)

ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARI Karar No: Tarih : ...../...../201.....

☐ UYGUNDUR ☐ UYGUN DEĞİLDİR

Enstitü Müdürü

Açıklama: Bu form Anabilim Dalı Akademik Kurul kararı ile birlikte gönderilecektir.

TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

Organofosforlu pestisitler esas toksik etkilerini asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu yoluyla gerçekleştirirler. Bununla birlikte, organofosforlu pestisitler ile metabolitleri dolaşıma geçtikten sonra gerçekleşen metabolik detoksifikasyon sürecinde; başta kan-beyin bariyeri ve merkezi sinir sisteminin ilgili hücreleri olmak üzere ortaya çıkan nörotoksisitenin de organofosfat toksikolojisinin bir parçası olduğu değerlendirilmektedir.

Tezin amacı; organofosfat metabolitlerinin insan hücre kültürlerinde neden olduğu nörotoksisitenin değerlendirilmesidir.

ÇALIŞMA YÖNTEMİ, PLANI VE MEVCUT İMKÂNLAR

Tez çalışmasında insan hücre kültürü kullanılacak olup Etik Kurul veya Etik Komisyon izni gerekli değildir.

İnsan hücre kültürleri (kan-beyin bariyeri ve merkezi sinir sistemi) uygun medyumlarda çoğaltıldıktan sonra karbondioksit inkübatöründe %5 CO_2'lik nemli bir atmosferde 37°C sıcaklıkta tutulacaktır. Sonrasında seçilecek en az iki adet organofosfat metaboliti hücrelere önceden belirlenmiş seyreltik konsantrasyonlarda uygulanacaktır.

Sitotoksisitenin değerlendirilmesi maksadıyla 0, 24., 48. ve 72. saatlerde hücre sağkalımı MTT testi ile tespit edilecektir.

Metabolitlerin ilgili hücrelerde neden olduğu oksidatif stresin tespiti amacıyla süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ELISA kitleri kullanılarak tayin edilecektir.

Sonuçların değerlendirilmesinde istatistiksel analiz yöntemleri kullanılacaktır.

Çalışma kapsamında kullanılacak hücre kültürleri ile inkübatör, laminar flow kabin, derin dondurucu, invert mikroskop ve spektrofotometre Enstitü bünyesindeki araştırma laboratuvarlarında mevcuttur. Test kitleri, sarf malzemeler ve kimyasalların bilimsel araştırma projesi kapsamında temin edilmesi planlanmaktadır.

Not: Tez çalışması için, Etik Kurul veya Etik Komisyon izni gerekli olup olmadığı, gerekli ise, bu iznin alınıp alınmadığı veya ne zaman alınacağı belirtilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Eyison RK et al. Evaluation of cytotoxicity of glutathione derived β-lyase metabolites of sulfur mustard on four different types of in vitro cell culture model. Medical Journal of İzmir Hospital, 24(2):95-101, 2020.
2. Kassa J, Stetina R. The evaluation of oxidative damage of DNA after poisoning with nerve agents. J Appl Biomed. 17(3):225-230, 2019.
3. Bajgar J. Organophosphate/nerve agent poisoning:mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. Adv Clin Chem 38: 151–216, 2004.
4. Pearson JN., Patel M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. Ann N Y Acad Sci. 1378(1): 17–24, 2016.
5. Jokanovic M., Risti D., Kovac B., Stojiljkovic MP. Biotransformation of warfare nerve agents. 963-966, Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2015.

YAPILAN ÇALIŞMANIN BİLİME GETİRDİĞİ YENİLİK:

Organofosforlu pestisitlerin insanda dolaşımına geçtikten sonra uğradıkları metabolik süreçte doku bazında neden oldukları nörotoksisite temelli etki mekanizması ortaya konulacaktır.

Tezin konusuna ilişkin anabilim dalında benzer araştırmalar yapıldı mı?

☒ EVET ☐ HAYIR

Cevabınız Evet İse (Yüksek Lisans ya da Doktora)

1. Bilimsel Araştırma Projesi: Evaluation of cytotoxicity of glutathione derived β-lyase metabolites of sulfur mustard on four different types of in vitro cell culture model.
   Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğ. Üyesi R. Koray Eyison

ETİK SÖZLEŞME

X Tez çalışmamda etik kurul veya etik komisyon **izni gerekli değildir.**

☐ Tez çalışmamda **etik kurul izni gereklidir ve alınacaktır.**

☐ Tez çalışmamda **etik komisyon izni gereklidir ve alınacaktır.**

☐ Tez çalışmamda etik kurul / etik komisyon **izni alınmıştır.**

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü lisansüstü öğrencisi olarak, tez danışmanımın rehberliğinde,

1. Tez önerisinde belirttiğim etik kurul / etik komisyon iznini, kurallara uygun şekilde alacağımı,
2. Tez önerisinde belirttiğim etik kurul / etik komisyon iznini, tez çalışmasına başlamadan önce alacağımı,
3. Almış olduğum etik kurul veya etik komisyon iznine bağlı kalacağımı, çalışmamda yapılacak olan ve ilgili kurulları bilgilendirmeyi gerektirecek değişikliklerde, gerekli bilgilendirmeyi etik kurul veya etik komisyona uygun şekilde yapacağımı,
4. Tez çalışması ile ilgili herhangi bir değişiklikte, etik kurul veya etik komisyonu bilgilendirme sorumluluğunun tarafımda olduğunu,

kabul ve taahhüt ediyorum.

Öğrenci
Burak DEMİRBAĞ

24 Kasım 2020

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Sermet SEZİGEN

24 Kasım 2020

9. ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ

I. Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Burak DEMİRBAĞ

Uyruğu:

Medeni Durumu:

Doğum Yeri ve Tarihi:

Yabancı Dil: İngilizce

İletişim:

II. Eğitim Bilgisi

Doktora: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Savunma Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbı KBRN Bilim Dalı Başkanlığı (2018…)

Yüksek Lisans: Ahmet Yesevi Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği (2020).

Lisans: Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları Yönetimi Bölümü (2020).

Lisans: Gülhane Askeri Tıp Fakültesi (2000).

Lise: İzmir Karataş Lisesi (1991).

Ortaokul: İzmir Güzelyalı Ortaokulu (1988).

İlkokul: Hakimiyeti Milliye İlkokulu (1985).

III. Mesleki Deneyim

Ocak 2001-Nisan 2001 Etimesgut Asker Hastanesi Acil Servisi

Nisan 2001- Haziran 2001 Sahra Sıhhiye Okulu

Haziran 2001- Eylül 2001 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hastanesi Stajyer Bölüğü

Ekim 2001- Haziran 2006 15.Füze Üs Komutanlığı

Temmuz 2006- Haziran 2013 4. Ana Jet Üs Komutanlığı

Haziran 2013-Eylül 2019 TSK Sağlık Komutanlığı

Eylül 2019- Halen 8. Ana Jet Üs Komutanlığı

IV. Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler ve Kitap ve Bölüm Yazarlığı

Eyison Ruşen Koray, Pakdemirli Ahu, Aydın Erkan, Sayın Ayla Öztürk, Kılıç Zahir, Demirbağ Burak, Ortatatlı Mesut, Sezigen Sermet, Kenar Levent (2020). Evaluation of the Medical Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear Awareness Level of Emergency Healthcare Professionals Serving On Different Centres. Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 4(2), 174-179.

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2018) Trıage Of Chemical Weapon Casualties On Battlefield, Balkan Military Medical Congress (Poster Presentation)

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2018) Recent Use Of Nerve Agents As Assassination Weapons Balkan Military Medical Congress (Poster Presentation)

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2018) Use Of Chemical Agents In Syria 2013 Till Today Balkan Military Medical Congress (Poster Presentation)

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2018) Long-Term Health Effects of Sulfur Mustard 9th International Conference of The Royal Medical Services (Oral Presentation)

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2019) The Use And The Future Of CBRN Protective Equipment Balkan Military Medical Congress (Oral Presentation)

Demirbağ Burak, Kenar Levent (2019) Acute Effects Of Sulfur Mustard Poisoning Balkan Military Medical Congress (Oral Presentation)

Demirbağ Burak, Sezigen Sermet, Kılıç Zahir, Kenar Levent (2019) Asetilkolinesteraz, AFAD, KBRN Kongresi (Poster Presentation)

Demirbağ Burak, Koçal Meryem (2019) Kimyasal Ajanlarla Meydana Gelen Kitlesel Yaralanmalarda Dekontaminasyon İlkeleri, AFAD KBRN Kongresi (Poster Presentation)

Demirbağ Burak, Sezigen Sermet, Kılıç Zahir, Kenar Levent (2019) Siyanür Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi İlkeleri, AFAD, KBRN Kongresi (Poster Presentation)

Kenar Levent, Pakdemirli Ahu, Ortatatlı Mesut, Sezigen Sermet, Eyison Ruşen Koray, Karaardıç Levent, Demirbağ Burak, Kılıç Zahir, Öztürk Ayla Sayın. Covid 19'dan Korunmak İçin Kişisel Koruyucu Ekipman Kullanımı, SBÜ T.KBRN AD, Ankara 2020.

V. Aldığı Sertifikalar

Uçuş Tabipliği Sertifikası, Eskişehir, Kasım 2001.

Aile Hekimliği, Ankara, 2005.

İşyeri Hekimliği, Ankara, 2013.

Hücre Kültürüne Dayalı Üretim Teknikleri, Diyarbakır, 2021.

VI. Katıldığı Eğitim, Kongre ve Çalıştaylar

NATO, Science and Technology Organization, HFM Congress, Ekim 2017

AFAD, KBRN Kongresi, Aralık 2017.

MSB SATEM, KBRN Savunma ve Güvenlik Eğitimi, Aralık 2017.

OPCW, Chemical Preparedness for Hospitals Workshop, Kasım 2018.

SBÜ Tıbbi KBRN Kursu, Mart 2019.

SBÜ Laboratuvar Biyogüvenlik ve Biyoemniyet Çalıştayı, Mayıs 2019.

NATO School, Senior CBRN Officer Course, Ekim 2019

AFAD, KBRN Kongresi, Aralık 2019.