

HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ VE SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS VE TANNİK ASİTİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

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

Sevil EROL^{1,2} , Bahar ÖZTÜRK KURT³ , Bircan DİNÇ⁴ , Semra ÖZDEMİR³ 

¹Beykent Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Odyometri Programı, İstanbul, Türkiye

²Beykent Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İstanbul Türkiye

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye

⁴Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul Türkiye

ORCID ID: S.E. 0000-0002-7711-2639; B.Ö.K. 0000-0002-1171-002X; B.D. 0000-0002-9717-6410; S.Ö. 0000-0001-5262-3574

Atıf/Citation: Erol S, Ozturk Kurt B, Dinc B, Ozdemir S. HEK 293 hücrelerine farklı doz ve sürelerde uygulanan klorpirifos ve tannik asitin hücre canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):56-63. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1175367>

ÖZ

Amaç: Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos, yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür ve etkisini asetilkolinesterazın etkinliğini engelleyerek, kalp kasında, düz kasta, merkezi sinir sisteminde asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenme ile gösterir. Pestisitler kanserin, nörodejeneratif hastalıkların, üreme bozukluğunun ve birçok organ fonksiyonunun bozulmasında risk faktörüdürler. Tannik asit(TA) antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserijen özellikleri ile geleneksel ve modern tıpta kullanılan bir polifenoldür. Çalışmamız insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK 293 hücre hattına klorpirifos ve tannik asitin farklı doz ve sürelerde uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olası etkilerini araştırmak üzere planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, kontrol, klorpirifos ve tannik asit grubu olmak üzere 3 grup ile yapılmıştır. HEK 293 hücrelerinde klorpirifos ve tannik asitin hücre canlılığı üzerine hangi dozlarda ve hangi sürelerde daha etkin olduğunu belirlemek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] ve xCELLigence analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla hücre kültürü ortamına 10, 30, 60 ve 90 µg/ml klorpirifos ve 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit eklenerek inkübasyon gerçekleştirilmiştir ve hücre canlılığı analizleri yapılmıştır.

Bulgular: 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplarda 24, 48 ve 72 saatlik sürede hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Klorpirifosa ait IC₅₀ (%50 baskılayıcı konsantrasyon) değeri 24 saatlik maruziyette 79,94 µg/ml bulunmuştur. Tannik asitin 25 µM uygulandığı grubun absorbans değerinin diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (p<0.001).

Sonuç: Klorpirifosun hücre canlılığı üzerinde özellikle yüksek dozlarda etkili olduğu ve canlılığı daha çok azalttığı görülmüştür. Tannik asitin hücre canlılığını artırmada etkili dozunun 10µM olduğu ve yüksek dozlarda canlılığı azaltma yönünde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: HEK-293, klorpirifos, tannik asit, Hücre canlılığı analizi

ABSTRACT

Objective: Chlorpyrifos, an organophosphate pesticide, is a widely used insecticide and shows its effect with poisoning by inhibiting the activity of acetylcholinesterase, causing acetylcholine accumulation in neuromuscular junctions, heart muscle, smooth muscle and central nervous system. Pesticides are risk factors for cancer, neurodegenerative diseases, neurotoxicity, reproductive dysfunction and deterioration of many organ functions. Tannic acid is a polyphenol used in traditional and modern medicine with its many properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic. Our study was planned to investigate the possible effects of the application of chlorpyrifos and tannic acid at different doses and durations on the cell viability of the human embryonic kidney cell HEK293 cell line.

Materials and Method: The study was carried out on 3 groups as control group, chlorpyrifos group and tannic acid group. MTT and xCELLigence analysis methods were used to determine at which doses and at what time chlorpyrifos and tannic acid were more effective on cell viability in HEK 293 cells. For this purpose, incubation was carried out by adding 10, 30, 60 and 90 µg/ml chlorpyrifos and 5, 10, 15, 20 and 25 µM tannic acid to the cell culture medium.

Results: It was observed that the cell viability of the 30 µg/ml, 60 µg/ml and 90 µg/ml chlorpyrifos groups decreased significantly over the 24, 48 and 72 hours compared to the control group. The IC₅₀ value of chlorpyrifos was found to be 79.94 µg/ml at 24-hour exposure. It was determined that the absorbance value of the group in which 25 µM of tannic acid was applied decreased significantly compared to the other study groups (p<0.001).

Conclusion: It has been observed that chlorpyrifos is effective on cell viability especially at high doses and decreases viability more. It has been determined that the effective dose of tannic acid in increasing cell viability is 10µM and it is effective in reducing viability at high doses.

Keywords: HEK-293, chlorpyrifos, tannic acid, Cell viability analysis

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sevil EROL E-mail: sevilrol@beykent.edu.tr

Başvuru/Submitted: 14.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 27.09.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 14.12.2022 •

Kabul/Accepted: 11.01.2023 • **Online Yayın/Published Online:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde ve kontrolsüzce artması, tüketime bağlı olarak gıdaya olan ihtiyacı sürekli olarak artırmakta ve yeterli miktarda ürün sağlanamamaktadır. Bugün tüm dünyada ve ülkemizde de ürün miktarındaki artışı sağlayabilmek amacıyla tarımda çeşitli zararlılarla mücadelede “pestisit” olarak adlandırılan çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak tarımda kullanılan bu ilaçlar, toprakta, suda ve ürünlerin üzerinde uzun zaman hiç bozulmadan kalabilmekte ve besin zinciri ile insanlara kadar ulaşmaktadır (1-2). Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür. Klorpirifos, daha çok temas ve gastrointestinal sistem toksisitesi yoluyla etkili olur. Dış parazitlerde ve konakçı organizmalarda kolinesteraz enzimiyle birleşip onu inhibe ederek etkisini gösterir. Organofosfatlı insektisitler, insanlarda ve hayvanlarda asetilkolini (ACh) parçalayan asetilkolinesterazın (AChE) etkinliğini dönüşümsüz olarak engeller ve vücutta nöromusküler kavşaklarda, kalp kasında, düz kasta, parasempatik sinir uçlarında ve merkezi sinir sisteminde bulunan kolinerjik sinapslarda asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenmeye yol açmaktadır (3-4).

Toksisiteyi, kimyasal ve fizyolojik faktörler, ısı, ilacın uygulandığı doz, uygulanma yolu ve diğer kimyasal maddelerle bir arada kullanılıp kullanılmadığı gibi faktörler etkilemektedir (3). Pestisitlerin bir grubu olan organofosfatlı insektisitler içinde yer alan klorpirifosun serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı ve oksidatif doku hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir. Oluşan radikallerin, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaksiyonları başlattıkları bilinmektedir (5). Reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasını ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla antioksidan savunma mekanizmaları etkin rol oynarlar (6).

Polifenol çeşitliliği arasında, tannik asidin geleneksel tıpta kullanımını, zehirli maddelerin detoksifiye edilmesinden, bitkisel tıbbın terapötik gücünün gösterilmesine kadar uzayan geniş bir yelpazede nesiller öncesine dayanmaktadır (7-8). Tannik asit, derinin, demir mazi mürekkebinin, kırmızı şarapların bitkisel tabaklanmasında ve çeşitli hastalıkları tedavi etmede geleneksel bir ilaç olarak kullanılan önemli bir bileşendir. Bitki kaynaklı polifenolik fitokimyasallar beslenme çeşitliliği içerisinde her yerde bulunabilir ve geniş bir kullanım alanına sahiptir (9-11). Mevcut araştırmalar, tannik asitin antikanserijen, antimikrobiyal, antitumörjenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiallerjik ve antioksidan etkinliğe sahip olduğunu ve kanamayı durdurabilme özelliğini göstermiştir. Ayrıca tannik asitin antiviral ve antifungal aktiviteleri de mevcuttur (12-15).

Tannik asitin oksidan ve antioksidan mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Tannik asit, hem geçiş metallere varlığında DNA hasarını indükleyerek bir prooksidan olarak hem de baskılayıcı hidroksil radikal üretimi ile antioksidan olarak işlev görebilmektedir (16-17). Tannik asitin hidroksil radikal oluşumuna karşı bir antioksidan olarak hareket ettiği ve yüksek süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit süpürücüyü sahip olduğu bilinmektedir. Ancak aynı zamanda bir prooksidan olarak hareket ettiği, en belirgin olarak kromatindeki bakır iyonlarını

bağladığı ve DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir (18-21). Bununla birlikte tannik asitler çözünebilir tanenler için verilebilecek en iyi örneklerdir. Sağlık alanında büzüştürücü, hemostatik, anti-septik, yatıştırıcı, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici, ateş düşürücü, peklilik yapıcı, antiromatizmal gibi etkilere sahip olan tanenlerin, bakır, kurşun ve alkaloid zehirlenmelerinde antidot olarak kullanıldığı bilinmektedir (22-24).

Bu çalışmada, daha çok deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda etkileri gözlemlenen klorpirifos insektisiti ile antioksidan ve prooksidan özellikleri olduğu bilinen tannik asitin insan embriyonik böbrek hücresi HEK 293 hücre hattında doz ve süreye bağlı olarak hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin MTT ve xCELLİnge yöntemleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda klorpirifosun “(Klorpirifos-etil (Safban 25 WP) -Safa Tarım A.Ş.)” ve tannik asitin “(TEKKİM Tannik Asit Pur. Gr. 500 Gr LB.TK.201783.00502)” hücre canlılığı üzerine etkilerini insan embriyonik böbrek hücrelerinde (Human Kidney Embryonic Cells – HEK 293) araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda kullandığımız HEK293 hücre hattı, Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection - ATCC® CRL1573™) soğuk zincir ile teslim alındı ve çalışma başlayana kadar Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında bulunan sıvı azot tankında -196°C’de muhafaza edildi.

Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak materyaller otoklavlanarak 37°C’lik etüvde sterilize edildi, ayrıca her çalışma öncesinde hücre kültürü laboratuvarı ve laminar akım kabini sterilize etmek amacıyla 15 dakika ultraviyole ışık (UV) kullanıldı. Hücreler deneysel çalışmada kullanılmak amacıyla sıvı azot tankından çıkartılarak 37°C’de su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüp içeriği, toplam hacim 6 ml olacak şekilde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren besiyerinden 5 ml konulan santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 dakika süresince 1500 RPM’de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti üzerine 500 µl besiyeri eklenip hücreler pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu 25 cm²’lik flasklara (T-25 kültür kabı) aktarıldı ve üzerine 5 ml besiyeri eklendi. Üzerine besiyeri eklenen hücreler CO₂ inkübatörde 37°C’de %5 CO₂ ve %97 nemli hava içerecek şekilde standart kültür ortamında inkübasyona bırakıldı.

Çalışma grupları 10, 30, 60 ve 90 µg/ml klorpirifos eklenerek hazırlanan klorpirifos grubu ile 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit eklenerek hazırlanan tannik asit gruplarıdır (9,25-28). Kontrol grubu ise içerisinde klorpirifos veya tannik asit bulunmayan besiyer ortamı ile oluşturulmuş gruptur. Tüm deney grupları belirlenen dozlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.

Hücre Canlılığı Analizleri

MTT Yöntemi: 1g MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] 200 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7.4 , 5 mg/ml) ile alüminyum folyoya sarılan balon

joje içerisinde karanlık ortamda vortexlenerek çözdürüldü ve 0.22 µm filtreden geçirildi. Deney aşamasından önce çözelti 37° C'lik su banyosunda ısıtıldı. Deneyde 3 ayrı 96'lık plate ile çalışıldı ve 96'lık plate kuyucuklarının her birinde 100 µl'de 10000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 37 °C'de %5 CO₂ inkübatöründe hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol, klorpirifos 10, 30, 60, 90 µg/ml ve tannik asit 5, 10, 15, 20, 25 µM konsantrasyonlarında uygulamalar yapıldı. Her bir kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyinde var olan medyum bir pipet ile alınıp 50 µl DMSO (Dimetyl Sulfoxide) ilave edildikten sonra tekrar 10 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılmış olan hücrelerin, mikroplate okuyucu ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Kontrol kuyucukları belirlenen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak belirlendi. Klorpirifos-etil ve tannik asit ilave edilmiş kuyucuklardan okunan absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. Sonuçta 24 saatlik MTT canlılık analizi sonuçları bulundu. 48. ve 72. saat MTT canlılık analizi sonuçlarını elde etmek için farklı konsantrasyondaki maddelerin hücrelere uygulanma işleminden sonra inkübasyon süreleri ayarlanarak tüm işlemler tekrarlandı. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi elde edilerek IC₅₀ (%50 baskılayıcı konsantrasyon) değerleri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

xCELLigence yöntemi: xCELLigence, elektriksel impedans teknolojisi sayesinde hücrelerin elektrotlara bağlanıp bağlanmamasına bağlı olarak ölçüm yapan, hücre bazlı olan mikroelektronik biyosensör sisteminden oluşur. xCELLigence, mikroelektronik hücre sensörü dizisinden oluşmaktadır. Sensör sayesinde elektronik empedansın ölçülmesini, elektrotlar üzerinde var olan değişikliklerin tespit edilmesini sağlar ve değişikliklerin izlenme olanağını sağlar. Hücre indeksi, elektrik empedansındaki değişikliklerin ölçülmesi amacıyla kullanılır. Hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi elektrod empedansını etkilemektedir. Hücre indeksindeki azalışa ve artışa göre elde edilen bilgiler yazılım ile değerlendirilip sonuçlandırılır. xCELLigence yöntemi ile hücre proliferasyonu yani hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı, sitotoksikite yani canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranı belirlenebilir. xCELLigence yöntemi hücre karakterizasyonu hakkında bilgi verir (29-30).

Çalışmamızda HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattı, %10 fetal bovine serum ve %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM besiyerinde gerektiğinde pasajlama işlemleri yapılarak yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar kültür ortamında çoğaltıldı. Hücreler besiyeri ortamında 37 °C'de ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde T25 hücre kültürü flakslarında kültüre edildi. Hücreler flaksta %80 doluluğa ulaştığında steril hücre kazıyıcı ile kazınarak ve falcon tüpüne aktarılacak şekilde soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Hücreler daha sonra e-plate'lere ekilmek üzere hücre sayım prosedürüne göre sayılıp, sayım sonucu elde edilen hücre sayısı 1x 10⁶ olarak hesaplandı.

RTCA (Real Time Cell Analysis) programında deneyde kullanılacak kuyucukların seçimi, hücre türü, kuyu başına kullanılacak hücre sayısı, kullanılacak bileşiğin adı, konsantrasyonu ve konsantrasyon birimi bilgileri girilerek deneyle ilgili veriler tanımlandı.

Plakaların cihazdan çıkarılacağı her bir aşama için (Step 1, Step 2 ve Step 3) ayrı ayrı planlamalar yapıldı. Blank okuması tamamlandığında plaketler inkübatörden laminar kabine alınıp 16 kuyulu e-plate'lerin her bir kuyusuna 150 µl'de yaklaşık 1.5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreleri ektikten 24 saat sonra madde uygulanacağı için "Duration" seçeneği 24 saate, kuyulardan 15 dakika aralıklarla ölçüm almak için "Interval" seçeneği 15'e ayarlandı. Bu süre sonunda, toplamda 16 kuyusu bulunan plakalara klorpirifos için 0, 10, 30, 60, 90 µg/ml ve tannik asit için 0, 5, 10, 15, 20, 25 µM konsantrasyonlarında madde uygulaması yapıldı. Hücre üzerine etkisi incelenen her bir madde için ayrı bir plaka kullanıldı. (Step 1: Interval 1:00 Duration 0:0:0; Step 2:Interval 15:00 Duration 24:00; Step 3: Interval 15:00 Duration 96:00)

Süre sonunda sistemden, alt kısmında iyi bir iletken olan altın ile kaplı elektrotlara yapışan hücre sayısına ve kontrol grubuna göre, hücrelerdeki değişime bağlı olarak hücre indeksi değerleri elde edildi. İstatistiksel değerlendirmenin yapılabilmesi için gerekli uygun sayıya ulaşabilmek adına her bir madde için iki 16'lı e-plate kullanılarak toplamda 6 ölçüm sonucu elde edildi.

İstatistiksel analiz: Örneklerin % canlılık değerleri hesaplandı. Sonuçlar IBM SPSS 21 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak değerlendirildi. Grup içi karşılaştırmalarda parametrik olmayan gruplar için Kruskal Wallis, parametrik olan gruplar için One-Way ANOVA testleri yapıldı. Sonuçlar ortalama ± SD (standart sapma) olarak verilip anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Klorpirifosun doza bağlı etkisinde MTT hücre canlılığı analizi
24 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; klorpirifosun 10 µg/ml uygulandığı grubun MTT değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (*p<0.05). 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml klorpirifos uygulanan grupların MTT değerleri de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi (^bp<0.001) (Tablo 1, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 79,94 µg/ml'dir. 48 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; 10 µg/ml, 30 µg/ml ve 60 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplarının absorbans değerlerinin 90 µg/ml uygulanan gruba göre anlamlı olarak artmış olduğu (^ap<0.001) görüldü. 10 µg/ml klorpirifos dozunun uygulandığı grubun MTT değeri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (^bp<0.05) (Tablo 2, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 48 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 85,95 µg/ml'dir. 72 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; 30, 60, 90 µg/ml uygulanan grupların absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma belirlendi (*p<0.001). Kontrol ve 10 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplar arasında 72 saatlik MTT sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 3, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 72 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 80,23 µg/ml'dir.

Tannik asitin doza bağlı etkisinde MTT hücre canlılığı analizi
24 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin 5µM uy-

Tablo 1: Klorpirifos'un (KP) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

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

^ap<0.05 ve ^bp<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında

Tablo 2: Klorpirifos'un (KP) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

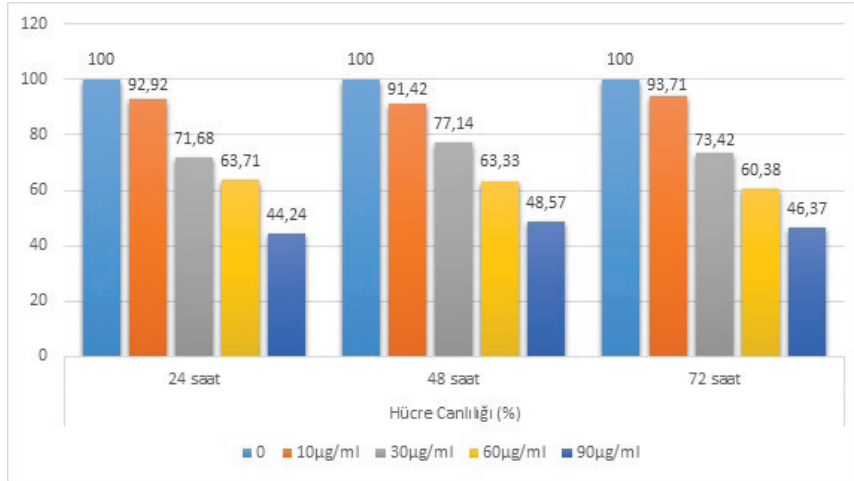
Parametre	Kontrol	10 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	90 µg/ml
MTT (570 nm)	0,210±0,02	0,191±0,02 ^{a,b}	0,162±0,01 ^a	0,133±0,01 ^a	0,102±0,01

^ap<0.001 90 µg/ml ile karşılaştırıldığında, ^bp<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında

Tablo 3: Klorpirifos'un (KP) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

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

^ap<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında



Şekil 1: Klorpirifos'a ait 24, 48 ve 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği

güldüğü grupta absorbanın kontrol grubuna göre ^ap<0.01 anlamlılığında azalmış olduğu gözlemlendi. 15 µM, 20 µM ve 25 µM tannik asit uygulanan gruplarda ise absorban değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı (^bp<0.001) belirlendi. 25 µM tannik asit uygulanan grubun absorban değerinin diğer çalışma gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (^cp<0.001) (Tablo 4, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 21,34 µM 'dır. 48 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin farklı dozlarda uygulandığı grupların 48 saat sonraki verileri incelendiğinde 10 µM uygulanan grupta kontrole göre anlamlı artışlar gözlemlendi (^ap<0.01). 20 µM ve 25 µM yüksek dozlarda

ise absorban değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlendi (^bp<0.001). 10 µM uygulanan grubunun absorban değerinin 5 µM ve 15 µM gruplarına göre (^cp<0.01) ve 20 µM ve 25 µM'lık gruplara göre (^dp<0.001) arttığı görüldü (Tablo 5, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 48 saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 23,99 µM'dır. 72 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin 10 µM uygulandığı grupta 72 saatlik maruziyette absorban değeri kontrole göre artmışken (^ap<0.001), 20 µM ve 25 µM uygulandığı gruplarda ise azaldı (^bp<0.001). 25 µM uygulanan grubun değerleri tüm gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (^cp<0.001) (Tablo 6, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 72

Tablo 4: Tannik asit'in 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

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

^ap<0.01, ^bp<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, ^cp<0.001 25 µM ile karşılaştırıldığında

Tablo 5: Tannik asit'in 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

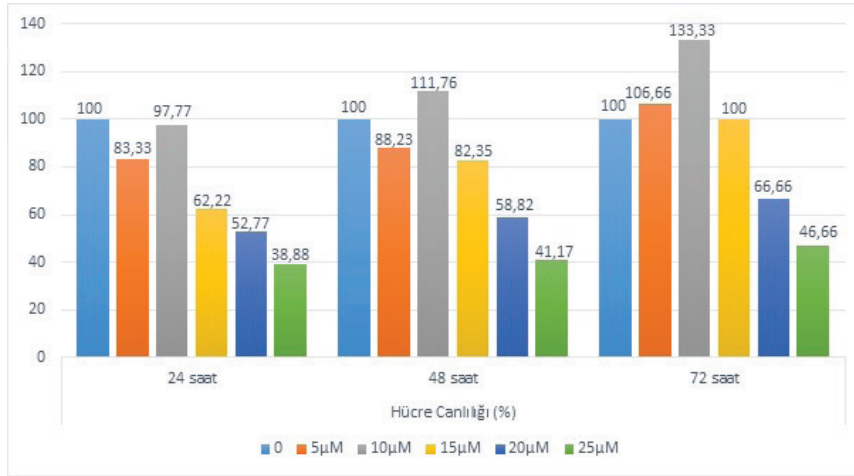
Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,17±0,01	0,15±0,01 ^c	0,19±0,01 ^a	0,14±0,02 ^{b,c}	0,10±0,03 ^{b,d}	0,07±0,02 ^{b,d}

^ap<0.01 ^bp<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, ^cp<0.01, ^dp<0.05 10 µM ile karşılaştırıldığında

Tablo 6: Tannik asit'in 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

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

^ap<0.001, ^bp<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, ^cp<0.001 25 µM ile karşılaştırıldığında



Şekil 2: Tannik asitin 24, 48 ve 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği

saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC₅₀ değeri 25,89 µM'dir.

xCELLigence Analiz Sonuçları

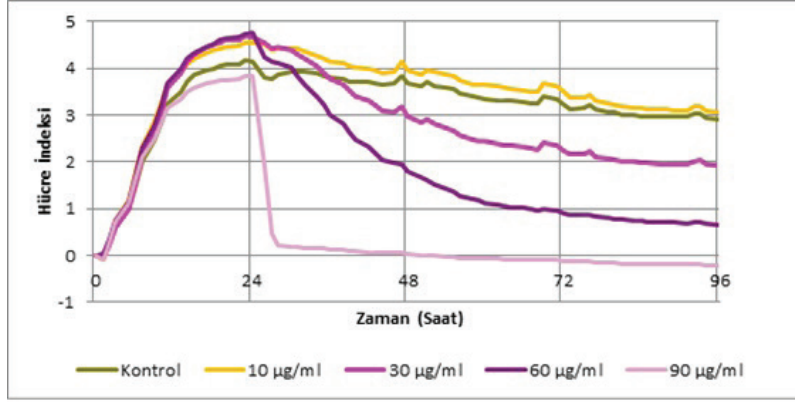
Klorpirifos'un xCELLigence Analiz Sonuçları

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 30 µg/mL ve 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruplarda hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (p<0.01). HEK293 hücrelerinin 48 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre 60 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin 10 µg/mL uygulanan gruba göre daha düşük olduğu tespit edildi (p<0.001). Kontrol grubu ve 10 µg/mL uygulanan grupların hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi (p<0.001). HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz

sonuçlarına göre 10 µg/mL uygulanan grubun hücre indeksinin 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p<0.01). 90 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin kontrol ve 10 µg/mL uygulanan gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı belirlendi (p<0.001) (Şekil 3).

Tannik Asit'in xCELLigence Analiz Sonuçları

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 25 µM tannik asit uygulanan grubun hücre indeksinin 20 µM uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu (p<0.01) belirlendi. 20 µM ve 25 µM tannik asit uygulanan grupların hücre indeksinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı (p<0.001). HEK293 hücrelerinin 48 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, 15 µM tannik asit uygulanan grubun



Şekil 3: Değişen konsantrasyonlarda klorpirifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi xCELLigence proliferasyon eğrileri

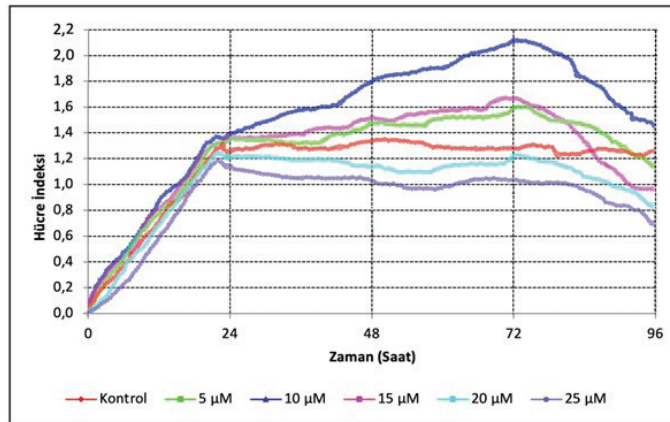
hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu belirlendi ($p < 0.05$). 20 μM ve 25 μM uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu belirlendi (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$). Tannik asitin 10 μM uygulandığı grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu görüldü ($p < 0.05$). HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre 20 μM ($p < 0.001$) ve 25 μM ($p < 0.001$) uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Tannik asitin 10 μM uygulandığı grubun hücre indeksi kontrol ($p < 0.01$), 20 ve 25 μM uygulanan gruplara göre $p < 0.001$ anlamlılığında yüksektir (Şekil 4).

TARTIŞMA

Organofosfatlı insektisitler kimyasal yapılarından dolayı yağda çözünebilirler (lipofiliktir) ve noniyonizedir. Lipofilik özelliklerinden dolayı hücre membranını, kan beyin bariyerini geçebilirler ve bu yollarla hasara yol açabilirler (4,31). Çalışmamızda kullandığımız klorpirifos toksisite yönünden orta düzeyde riskli olan bir organofosfatlı insektisit grubu içerisinde yer almaktadır ve maruz kalındığında başlıca hepatoksisite, nörotoksisite ve endokrin sistem bozuklukları görülmektedir. Özellikle merkezi

sinir sisteminde nörolojik toksisite yanında DNA hasarına da neden olarak çok ciddi hasarlara yol açmaktadır. Bazı çalışmalar klorpirifosa maruziyetin gelişimsel bozuklukla, otoimmün sistem patolojileri ile, akciğer, böbrek ve meme kanseri gibi kanser türleriyle bağlantılı olduğunu da göstermiştir (32).

Ulusal Bilimler Akademisi raporu, 21. yüzyılda toksisite testlerinde, in vitro yola dayalı toksisite testini genişletmek ve tüm hayvan yaklaşımlarını en aza indirmek için diğer bilimsel araçların kullanımına yönelik bir paradigma değişikliğinin temelini atmıştır (Ulusal Araştırma Konseyi, 2007). Maruz kalan insan hücre kültürlerinin biyoinformatik analizleri gibi bu alternatif yöntemler, bir yaklaşım kullanarak in vivo toksisiteyi tahmin etmede kabul görmektedir (9). Geleneksel olarak, pestisitlerin toksik potansiyelini incelemek için hayvan modelleri kullanılmaktadır. Günümüzde daha fazla sayıda yeni pestisit keşfedilmesiyle, toksisiteyi tespit etmek için in vivo modellerin kullanılması zaman, etik ve maliyet açısından pratik olmadığı anlaşıyor kabul görmeye başlamıştır. In vitro hücre kültürü sistemlerinin, kimyasallar veya ilaca maruz kalma yoluyla hedef organlarda toksisite tahmini için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Hücre tabanlı sistemler, yüksek düzeyde entegrasyon sunduğundan, kimya-



Şekil 4: Değişen konsantrasyonlarda Tannik Asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi xCELLigence proliferasyon eğrileri

salların bozulmamış hücrelerle etkileşimlerini incelemek için popüler hale gelmiştir. Toksikite çalışmaları için karaciğer, böbrek, nöron vb. çeşitli in vitro hücre sistemleri geliştirilmiştir. Çalışmada kullandığımız böbrek hücre kültürü sistemi, ksenobiyotiklerin vücuttan atılmasını ve toksisitesini göstermesi açısından ideal ortam şartlarını barındırmaktadır (33).

Klorpirifos'un HEK293 hücrelerine etkisini araştırmak için uyguladığımız dozların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığındaki azalmanın doza bağlı olarak değiştiğini söyleyebiliriz. Toksik etkisini gördüğümüz klorpirifosun, doz arttıkça hücre canlılığında % 44,24'e kadar azalma meydana getirdiği görülmüştür.

Çok sayıda biyoaktif bitkisel biyomoleküller arasında, polifenoller her zaman faydalı özellikleri göz önünde bulundurularak odak noktası olmaya devam etmektedir. Sağlığa yararlı bir aile olarak tanımlanan polifenollerin, antikanser, antimutajenik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiseptik ve antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir (9). Tannik asit, benzersiz biyokimyasal özellikleri nedeniyle biyoloji ve tıbbi araştırmalar alanında son on yılda popülerlik kazanmış, doğal olarak oluşan bir antioksidan polifenoldür. Kullanımının temel olarak hidroksil grubu, proteinler ve diğer biyomoleküllerle bağlar özellikle hidrojen bağları oluşturmaya yönelik afinitesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tannik asit ile yapılan çalışmalar, birçok yeni farmasötik ve biyomedikal uygulamanın geliştirilmesine yol açmıştır. Tannik asitin bir antioksidan olarak iltihabi azalttığı, yaygın patojenik bakteride bir antibiyotik görevi gördüğü ve çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (7).

Çalışmamız sonucunda tannik asitin belli bir doz artışından sonra toksik olabileceğini ve prooksidan özellik gösterebileceğini, dozu arttırdığımızda azalmış hücre canlılığı ile ifade edebileceğimizi düşünmekteyiz. Tannik asitin antioksidan mı yoksa oksidasyonu artıran bir prooksidan gibi mi davrandığı tamamen konsantrasyonla ilişkilidir. Farklı konsantrasyonlarda antioksidan ve prooksidan özelliğe sahip oluşu her iki durum için de tannik asitin olumlu katkısı olduğunu gösterir, çünkü prooksidan özelliği ile oksidatif stresi indüklemek ve metal iyonlarını bağlama yeteneğine sahip olup antibakteriyel ve antikanser özellik gösterir (21, 23, 34-36).

Çalışmamızın temel hedeflerinden biri tannik asitin hücre canlılığına etkisini, en çok bilinen ve kullanılan MTT yöntemi yanında empedans değişimi esaslı olan xCELLigence analizi yöntemi ile de görmekti. Yöntemler arasında tannik asit etkinliğini değerlendirmede hücre çoğalmasında olumlu yönde etkileyen dozların her iki yöntemde de aynı dozlar olduğu tespit edilmiştir. Yüksek doz tannik asit uyguladığımız gruplarda her iki yöntemde de hücre canlılığının kontrole göre anlamlı olarak azaldığını bulduk. Kullanılan farklı yöntemlerin sonuçlarının birbirini desteklemekte oldukları görülmüştür.

Çalışma sonunda bulduğumuz IC50 değerlerinin bu hücre hattı kullanılarak yapılacak diğer çalışmaları planlamada fayda sağlayacağını söyleyebiliriz. Klorpirifos toksisitesini azaltabilecek

oksidan ve antioksidan maddeler ile ilgili olan ve tannik asitin bu toksisite de ne yönde hareket edeceğini tespit edecek çalışmalar yapılmasının gerekli olduğunu ifade edebiliriz.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.E., S.Ö.; Veri Toplama- B.Ö.K., B.D.; Veri Analizi/Yorumlama- S.Ö., B.Ö.K., S.E., B.D.; Yazı Taslağı- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.Ö., S.E.; Son Onay ve Sorumluluk- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

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

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.E., S.Ö.; Data Acquisition- B.Ö.K., B.D.; Data Analysis/Interpretation- S.Ö., B.Ö.K., S.E., B.D.; Drafting Manuscript- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.; Critical Revision of Manuscript- S.Ö., S.E.; Final Approval and Accountability- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University-Cerrahpaşa Scientific Research Projects Unit (Project number: 34836).

KAYNAKLAR

1. Kurutaş EB, Kılınc M. Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2003;12(3):215-28.
2. Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. Ankara. 2005.p.344-55.
3. Sağmanlıgil H. Tavuklarda ivermektin ve klorpirifosun toksikolojik etkileşim özellikleri üzerinde deneysel araştırmalar., YYÜ Vet Fak Derg 1994;5(1-2):65-84.
4. Türkmen R, Özdemir M. Klorpirifos-Etil uygulanan diyabetli ratlarda likopenin antioksidan ve hipoglisemik etkilerinin araştırılması. Kocatepe Vet J 2015;8(1):1-17.
5. Mercan S, Eren B, Dinç N. Pestisit klorpirifosun rat (wistar albino) karaciğerinde oluşturduğu hasar üzerine kurkuminin antioksidan etkisinin incelenmesi. Anadolu J Agr Sci 2017;32(1):132-38.
6. Kayhan FE, Kaymak G, Akbulut C, Ertuğ ND. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in zebra balığı (Danio rerio Hamilton, 1822) solungaçlarında antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon seviyesi üzerine akut etkilerinin belirlenmesi. Trakya Univ J Nat Sci 2017;18(2):143-48.
7. Baldwin A, Booth B. Biomedical applications of tannic acid. J Biomaterials Appl 2022;36(8):1503-23.
8. Wilson WC, Macgregor AR, Stewart CP. The clinical course and pathology of burns and scalds under modern methods of treatment. Br J Surg 1938;25(100):826-65.
9. Perumal P, Mhlanga P, Somboro MA, Amoako DG, Khumalo HM, Khan RM. Cytoproliferative and anti-oxidant effects induced

- by tannic acid in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Biomolecules* 2019;9(12):767-84.
10. Croft K. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch Biochem Biophys* 2016;595:120–24.
 11. Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci* 2018;13(1):12–23.
 12. Zhang PY. Polyphenols in health and disease. *Cell Biochem Biophys* 2015;73:649–64.
 13. Somboro AM, Osei Sekyere J, Amoako DG, Kumalo HM, Khan R, Bester LA, et al. In vitro potentiation of carbapenems with tannic acid against carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Exploring natural products as potential carbapenemase inhibitors. *J Appl Microbiol* 2019;126(2):452–67.
 14. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* 2015;5:27540–57.
 15. Myint KB, Sing LC, Wei Z. Tannic acid as phytochemical potentiator for antibiotic resistance adaptation. *APCBEE Procedia* 2013;7:175-81.
 16. Sieniawska E, Baj T. Tannins. In: Simone B, Rupika D, editors. *Pharmacognosy*. Elsevier London UK 2017, pp.199-232.
 17. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem* 2010;3(1):43-53.
 18. Greenwell M and Rahman PK. Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6(10):4103–12.
 19. Khan HY, Hadi SM, Mohammad RM, Azmi AS. Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. *Functional foods in cancer prevention and therapy*. London: Academic Press 2020, pp.221-36.
 20. Ullah MF, Khan HY, Zubair H, Shamim U, Hadi SM. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67(1): 103-10.
 21. Farhan M, Oves M, Chibber S, Hadi SM, Ahmad A. Mobilization of nuclear copper by green tea polyphenol epicatechin-3-gallate and subsequent prooxidant breakage of cellular DNA: implications for cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):34-48.
 22. Tatlı O. İnorganik veya organik çinko kapsayan etlik piliç rasyonlarına tannik asit katılmasının performans ve sindirilebilirlik üzerine etkisi. Adnan Menderes Üniv. 2015.
 23. Aşkın M. Ratlarda midpalatal sutur osteotomisi ile uygulanan üst çene genişletmesi sonrası kemik oluşumuna tannik asitin etkisinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniv. 2019.
 24. Çalışlar S. Tanenlerin kanatlı hayvan beslemede etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 2018;21(4):615-23.
 25. Taşpınar E. Klorpirifos uygulanan HEK 293 hücrelerinde antioksidan kullanımının apoptoz ve oksidan sistem üzerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniv. 2019.
 26. Özsoğacı N. Elektromanyetik alan uygulamasının (Wi-Fi 2.4 GHz) insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) apoptoz ve oksidatif stres değerleri üzerine selenyum ve çinkonun etkisi. İstanbul Üniv. 2016.
 27. Ergün D. Hipoksi ve hiperkapninin insan embriyonik böbrek hücre membranında (HEK293) TRPM2 kanal aktivitesine etkisinin patch clamp tekniği ve enzimatik ölçümler ile araştırılması. İstanbul Üniv. 2018.
 28. Chu X, Guo Y, Xu B, Li W, Lin Y, Sun X, et al. Effects of tannic acid, green tea and red wine on hERG channels expressed in HEK293 cells. *Plos One* 2015;10(12):1-13.
 29. xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Genomax Technologies. URL: <https://www.genomaxtech.com/index.php/popular-articles/147-xCelligence>.
 30. Ke N, Wang X, Xu X, Abbasi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011;740:33-43.
 31. Demirdöğen B. Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg* 2010;67(2):97-112.
 32. Sun L, Zhang S, Guo W, He W, Qian Y, Qu G, et al. Sublethal exposure of organophosphate pesticide chlorpyrifos alters cellular iron metabolism in hepatocytes and macrophages. *Int J Mol Med* 2014;34(5):1395-400.
 33. Polláková J, Pistl J, Kovalkovičová N, Csank T, Kočiřová A, Legáth J. Use of cultured cells of mammal and insect origin to assess cytotoxic effects of the pesticide chlorpyrifos. *Pol J Environ Stud* 2012;21(4):1001-06.
 34. Mitra I, Saha A and Roy K. Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. *Mol Simulation* 2010;36(13):1067-79.
 35. Kaczmarek B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. *Materials* 2020;13(14):3224.
 36. Saraiva MA, Castro RH, Cordeiro RP, Sobrinho TP, Castro VA, Amorim EC, et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol* 2011;5(14):1724-31.