

Fipronilin Genel Özellikleri ve Toksisitesinin Mekanizmaları

General Properties of Fipronil and the Mechanisms of its Toxicity

 Sedat GÖKMEN,^a
 Dilek GÜVENÇ^b

^aVeterinerlik Bölümü,
 Amasya Üniversitesi
 Suluova Meslek Yüksekokulu,
 Amasya, TÜRKİYE
^bFarmakoloji ve Toksikoloji AD,
 Ondokuz Mayıs Üniversitesi
 Veteriner Fakültesi,
 Samsun, TÜRKİYE

Received: 11.06.2018
 Received in revised form: 18.09.2018
 Accepted: 18.09.2018
 Available online: 05.12.2018

Correspondence:
 Sedat GÖKMEN
 Amasya Üniversitesi
 Suluova Meslek Yüksekokulu,
 Veterinerlik Bölümü, Amasya,
 TÜRKİYE/TURKEY
 sedat.gokmen@amasya.edu.tr

ÖZET Fipronil; fenilpirazol grubunda yer alan geniş spektrumlu bir insektisittir. Bu insektisit zirai alanda ve veteriner hekimliğinde pek çok zararlıya karşı kullanılmaktadır. Son yıllarda fipronil kullanımının artmasına bağlı olarak hedef dışı canlılara yönelik tehlikeler ve ekosistemdeki güvenliğine ilişkin ciddi endişeler ortaya çıkmıştır. İn vivo ve in vitro çalışmalarda, fipronil toksisitesinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Fipronil tarafından uyarılan oksidatif stres antioksidan savunma sistemini değiştirebilmekte ve lipitler, DNA ve protein hasarına yol açabilmektedir. Bu çalışmada, fipronilin genel özellikleri ve toksisitesinde rol oynayan mekanizmalar hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fipronil; toksisite; oksidatif stres

ABSTRACT Fipronil is a broad-spectrum insecticide which exists in phenylpyrazole group. It is used against many pests in agriculture field and veterinary medicine. In recent years, due to its increased usage there have been serious concerns arisen on the health of non-target organisms and ecosystem safety. In vivo and in vitro studies showed that oxidative stress plays important role in fipronil toxicity. Oxidative stress induced by fipronil can alter the antioxidant defense system and lead to lipids, DNA and protein damage. In this review, the general characteristics of fipronil and the mechanisms that play a role in its toxicity are given.

Keywords: Fipronil; toxicity; oxidative stress

FİPRONİLİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Fenilpirazoller veya fiproller olarak adlandırılan insektisit sınıfında yer alan ve organik bir insektisit olan fipronil; Rhône-Poulenc firması tarafından 1987 yılında geliştirilmiştir.^{1,2} Fipronil geniş spektrumlu olması nedeni ile zirai alanda pirinç, pamuk, mısır, tahıl ürünlerinde (arpa, yulaf, çavdar, tritikale ve buğday), mera çimlerinde, çevre sağlığı alanında hamam böceği, sivrisinek, çekirge mücadelesinde ve veteriner hekimliği alanında pire, kene gibi pek çok zararlıya karşı ülkemizde ve tüm dünyada kullanılmaktadır.^{3,4} Piretroid, organik fosforlu ve karbamat insektisitlere karşı direnç kazanmış insektler üzerinde fipronil düşük dozlarda etki gösterebilmektedir.⁵ Son yıllarda fipronilin kullanımının artmasına bağlı olarak, hem hedef dışı canlılara (özellikle insan) yönelik tehlikeler artmış hem de ekosistemdeki güvenliğine ilişkin ciddi endişeler ortaya çıkmıştır.⁶ Ülkemizde şu an fipronil içeren; kedi ve köpeklerin ektoparaziter

mücadelesinde kullanılan 24 ruhsatlı veteriner müstahzar ve tarım alanında mısır ile ayçiçeğindeki telkurduna (*Agriotes spp.*) etki eden beş ruhsatlı zirai müstahzar bulunmaktadır [(https://vtu.tarim.gov.tr, https://bku.tarim.gov.tr/AktifMadde/Details/423 (Erişim tarihi: 13.09.2018)].

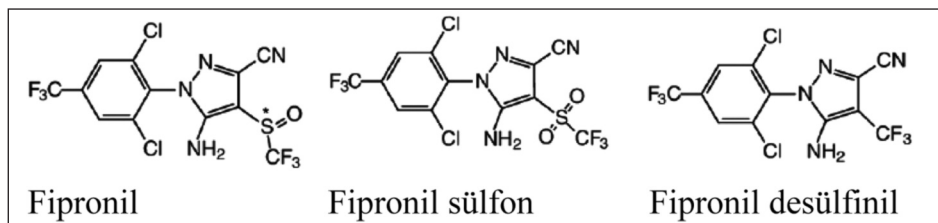
Kimyasal formülü $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, kimyasal adı 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1*R,S*)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile olan fipronilin saf formu küf kokulu ve beyaz toz hâlinindedir.⁷

Fipronilin; fipronil desülfinil, fipronil sülfon, fipronil sülfid ve fipronil amid olmak üzere dört metaboliti mevcuttur.⁸ Memelilerde üç ana mekanizma ile metabolize edilir. Sülfon grubunun yükseltilmesi ile fipronil sülfona, indirgemesi ile fipronil sülfide ve siyano grubunun hidrolizi ile fipronil amide dönüştürülmektedir.⁹ Çevrede ise oksidasyon yoluyla fipronil sülfide, fotolitik yolla fipronil desülfinile, hidrolitik yolla fipronil sülfona ve biyotik yolla fipronil amide dönüştürülmektedir.⁵ Fipronil ve ana metabolitlerinin kimyasal yapısı Şekil 1'de görülmektedir.¹⁰

Fipronil etkisini gama aminobütirik asit (GABA) reseptörüne etki ederek oluşturmaktadır. Fipronil veya ana metabolitleri (fipronil sülfon ve fipronil desülfinil) böceklerin GABA_A- klor kanallarına yarışmaz bir şekilde bağlanıp, sinir sisteminde GABA'nın baskılayıcı etkisini bloke ederek etki meydana getirmektedir. Düşük dozları hiperaktiviteye, yüksek dozları ise felç ya da ölüme yol açmaktadır.² GABA kanalları hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda sinirsel uyarıların iletiminden sorumlu olmasına rağmen, fipronil omurgalı hayvanların GABA reseptörlerine omurgasız hayvanların kinden daha zayıf bir şekilde bağlanmakta; insektlerde bulunan GABA'ya

bağımlı klor kanallarına memelidekine göre 500 kattan daha fazla afinite duymaktadır.⁴ Böceklerde GABA'nın β3 alt birimi aracılığıyla etki gösterdiği için bu reseptör üzerindeki etkisi memeli reseptörlerine göre daha seçicidir.² İnsanlarda GABA_A reseptörü α, β, γ alt birimlerinin kombinasyonlarından oluşmakta ve γ alt biriminin yapısı bazı böceklerin γ alt birimi ile benzerlik göstermektedir. İnsan beyninde, fipronilin β3 alt birimine bağlanması, diğer alt birimlerin çeşitli kombinasyonları tarafından zayıflatılmaktadır. Fipronilin böcek beynine olan ilgisi insan beyin reseptörlerine göre yaklaşık 1.000 kattan daha fazladır. Bu oran α-endosülfan ve lindan gibi organik klorlu insektisitlerin reseptöre olan ilgisi ile karşılaştırıldığında çok daha fazladır. Bu durum, fipronilin böceklere yüksek seçiciliğini ve diğer insektisitlerle karşılaştırıldığında daha güvenli olduğunu açıklayabilmektedir.¹¹ Ancak, fipronil sülfon ve fipronil desülfinilde bu seçici etki daha azdır. İnsan ve hayvanlarda fipronil hızlı bir şekilde biyotransformasyona uğrayarak fipronil sülfon metabolitine dönüştürülmekte ve vücutta uzun süre kalabilmektedir. Bu nedenle memelilerdeki toksik etkiler aslında fipronil sülfon metabolitinden kaynaklanmaktadır. Fipronil desülfinilin toksisitesi nitelik olarak fipronile benzemektedir.³

Fipronil, Dünya Sağlık Örgütü tarafından Sınıf II orta derecede tehlikeli insektisit olarak sınıflandırılmıştır. İnsan, fare, sıçan, tavşan, etçil hayvanlar, kedi ve köpeklerde fipronil kaynaklı zehirlenme olaylarına rastlanmıştır.⁶ Fipronile insan ve hayvanlar genellikle kontamine olmuş su veya toprak aracılığıyla ya da hatalı kullanım sonucu maruz kalmaktadırlar. Maruziyet sonucu bu canlılarda nörotoksik, hepatotoksik, nefrotoksik ve sitotoksik etkiler meydana gelmektedir.¹¹⁻¹³



ŞEKİL 1: Fipronil, fipronil sülfon ve fipronil desülfinilin kimyasal yapısı.

Fipronil ve metabolitleri kan-beyin bariyerini geçerek GABA_A ve GABA_C reseptörlerine bağlanabilmektedir.^{14,16} Fipronil sülfon, fare ve insanlarda bulunan GABA reseptörlerine fipronilden altı kat fazla ilgi gösterip bağlanabilme özelliğine sahiptir.¹⁷ Sitokrom P450 (CYP450)'ye bağımlı enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon sonucu oluşan fipronil sülfon metaboliti ve çevresel yıkımlanma ürünü olan fipronil desülfonil metabolitinin toksisitesi böcek, balık, kuş ve memeliler için fipronilden daha yüksektir.¹⁸ Fipronil desülfonil metaboliti memelilerde GABA'ya bağımlı klor kanallarında 10 kat daha fazla etkinliğe sahiptir.¹⁹ Hem fipronil hem de metabolitleri birçok su canlısı için oldukça toksik etkilidir ve bazılarında birikebilme özelliği göstermektedir. Örneğin; karideslere (*Americamysisbahia*) ppt (ng/L), su piresine (*Daphnia pulex*) ve balığa (*Bluegill sunfish*) ppb

(µg/L) gibi oldukça düşük düzeylerde etkilidir.⁵ Bazı kuş türlerinde toksisitesi değişmekle beraber, fipronil kuşlarda ağız yoluyla akut ve subakut zehirlenmeye yol açabilmektedir. Çeşitli canlılar için öldürücü doz (öldürücü doz, LD₅₀) ve öldürücü konsantrasyon (ölmüclül konsantrasyon, LC₅₀) değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

FİPRONİLİN TOKSİSİTESİNE ARACILIK EDEN MEKANİZMALAR

Son yıllarda farklı türlerde (fare, sıçan, balık, bal arısı gibi) yapılan in vivo ve özellikle nöron kökenli hücre hatlarında yapılan in vitro birçok çalışmada, fipronilin toksisite mekanizmasında reaktif oksijen türleri [reactive oxygen species (ROS)] nin artması sonucu şekillenen oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Oksidatif stres; antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz olması veya hidroksil radikali, süperoksit anyonu, peroksit gibi

TABLO 1: Bazı omurgalı ve omurgasız hayvanlarda fipronilin LD₅₀ ve LC₅₀ değerleri.

Test	Tür	Fipronil		
LD ₅₀	Omurgalı	Memeli	Rat, <i>Rattusnorvegicus</i>	97 mg/kg (MT) ¹⁰
			Fare, <i>Mus musculus</i>	95 mg/kg (MT) ²⁰
		Kuş	Yabani ördek, <i>Anas platyrhynchos</i>	>2.000 mg/kg (akut) (PNT) ¹⁰
				>5.000 mg/kg (Diyette 5 gün) (PNT) ¹⁰
			Bobwhite bıldırcını, <i>Colinusvirginianus</i>	11,3 mg/kg (akut) (HT) ¹⁰
				49 mg/kg (Diyette 5 gün) (HT) ¹⁰
			Kızıl ayaklı keklik, <i>Alectoris rufa</i>	34 mg/kg (HT) ²¹
			Bayağı sülün, <i>Phasianuscolchicus</i>	31 mg/kg (HT) ²¹
			Şehir güvercini, <i>Columba livia</i>	>2.000 mg/kg (PNT) ⁴
			Alan serçesi, <i>Spizella pusilla</i>	1.120 mg/kg (ST) ⁴
	Zebra ispinozu, <i>Taeniopygia guttata</i>	310,2 mg/kg (MT) ²²		
	Saçaklı kertenkele, <i>Acanthodactylus dumerili</i>	30 mg/kg (HT) ²³		
	Omurgasız	İnspekt	Karasinek	0,13 mg/kg ²⁴
			Bal arısı, <i>Apis mellifera</i>	1,06 ng/arı ²⁵
Karıncı, <i>Atta sexdens rubropilosa</i>			1,42 ng/karıncı ²⁶	
LC ₅₀	Omurgalı	Balık	Gökkuşluğu alabalığı, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,246 mg/L (HT) ¹⁰
			Koi, <i>Cyprinus carpio</i>	0,34 mg/L (HT) ²⁷
			Nil tilapyası, <i>Oreochromis niloticus</i>	0,042-0,147 mg/L (VHT-HT) ⁴
			Sheepshead minnow, <i>Cyprinodon variegatus</i>	0,13 mg/L (HT) ⁴
			Zebra balığı, <i>Danio rerio</i>	0,22 mg/L (24 h) (HT) ²⁸
			Ay balığı, <i>Lepomis macrochirus</i>	0,083 mg/L (VHT) ¹⁰

EPA (2012)'ya göre toksisite sınıflandırması; **PNT:** Pratik olarak toksik değil; **ST:** Az zehirli; **MT:** Orta derecede zehirli; **HT:** Zehirli; **VHT:** Çok zehirli. Kuşlar, memeliler ve sürüngenler için: PNT> 2.000, ST 501-2.000, MT 51-500, HT 10-50, VHT <10. Balık ve amfibiler için: PNT>100, ST>10-100, MT>1-10, HT 0,1-1, VHT<0,1. LD₅₀ ünitelerindeki kg doz uygulanan omurgalı hayvanın vücut ağırlığını gösterir.

ROS ve nitrik oksit (NO) gibi serbest nitrojen türleri [reactive nitrogen species (RNS)] nin fazla üretiminden meydana gelmektedir.³ Fipronil tarafından uyarılan oksidatif stres çalışmalarında; malondialdehit, tiyobarbitürat reaktif maddeler, protein karbonilin arttığı, DNA bütünlüğünün azaldığı ve DNA kırılmalarına neden olduğu çeşitli metotlarla saptanmıştır. Bu biyobelirteçler fipronilin rol oynadığı protein, lipid ve DNA hasarını göstermektedir. Oksidatif stresin meydana gelmesinde birçok biyolojik yanıt ve hücre sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla apoptoz, hücre döngüsü ve sinyal iletiminin uyarılması ya da inhibisyonundaki önemli değişiklikler sonucu birçok toksik etki oluşmaktadır. Fipronil aracılı oksidatif stresin apoptoz ve otofajiyi tetiklemesindeki rolü ve ilgili hücre sinyal yolakları *in vitro* olarak geniş bir şekilde incelenmiştir.³ Genel olarak fipronilin *in vitro* ve *in vivo* sitotoksitesinde mitokondriyal p53, konstitütif androstan reseptörü [constutive androstone receptor (CAR)]/pregnane-X-reseptörü [pregnane-X-receptor (PXR)], protein kinaz B [protein kinase B (Akt)]/GSK3 β (glycogen synthase kinase-3, glikoz sentetaz kinaz-3), mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz [mitogen-activated protein kinase (MAPK)], Ca⁺² gibi farklı yolakları kullanarak apoptotik, otofajik hücre ölümü veya hücre hasara yol açtığı bildirilmiştir.²⁹⁻³³ Apoptoz ve otofaji genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölüm şekilleridir. Apoptoz; hücrede büzülme, apoptotik cisimlerin oluşumu, hücre membranında çıkıntı oluşumu ve DNA'daki değişiklikler ile karakterizedir. Otofaji; mitokondri ve diğer organeller, proteinler, uzun yapı proteinler ve diğer sitoplazmik bileşenlerden (lipit, sitoplazma) oluşan çift zarlı otofagozom ile çevrilerek lizozomlara taşınması ile karakterizedir. Hücrede; apoptoz ve otofaji farklı enzim, protein ve yolaklar aracılığıyla meydana gelebilmektedir. Genel olarak ve fipronilin neden olduğu apoptozu belirlemek için aktif kaspaz-3, aktif kaspaz-9 enzimleri ve otofajiyi belirlemek için Beclin-1 otofaji ile bağlantılı protein 6 ile mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3-II (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-

phosphatidylethanolamine conjugate, LC3-II) proteinlerinin seviyeleri en çok araştırılan biyobelirteçlerdir.³⁴ Fipronilin sitotoksik etkisi ise MTS (3-(4,5-dimetil tiyazol-2-yl)-5-(3-karboksi metoksi fenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum), WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetra zolyum) gibi sitotoksitesite testleri kullanılarak saptanmaktadır. Fipronil ile ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar Tablo 2 ve 3'te görülmektedir.³ Oksidatif stres; hücrede antioksidan savunma sistemini tüketerek lipid, protein ve DNA gibi hücre makromoleküllerin hasarına ve peroksidasyonuna neden olmaktadır. Oksidatif stres sonucu apoptotik, otofajik ya da nekrotik mekanizmalarla hücre ölümü meydana gelmektedir.³⁵⁻³⁷ Özellikle fipronil sülfon metabolitinin fipronile kıyasla daha fazla ROS üretimine yol açtığı ve dolayısıyla daha toksik olduğu düşünülmektedir.³

APOPTOZ VE HÜCRE DÖNGÜSÜ

Birçok biyolojik yanıt ve hücre sinyal yolağında önemli rol oynayan oksidatif stres; apoptoz, otofaji, hücre döngüsü ve sinyal iletiminin uyarılması ya da baskılanması gibi çeşitli toksik etkilere neden olmaktadır.³ ROS üretiminin fazla olması oksidatif strese neden olarak, apoptotik hücre ölümüne yol açabilmektedir. Apoptoz; fizyolojik hücre ölümünün bir şekli olup; hücre küçülmesi, apoptotik cisimciklerin oluşumu, hücre zarının yüzeyinde çıkıntılarının oluşumu, DNA'nın oligo nükleozomlara parçalanması ile karakterizedir.³⁸ Kahn ve ark.nın yaptığı *in vivo* çalışmada; fipronil uygulanan (5-10 mg/kg vücut ağırlığı) erkek ratlarda maruziyet sonrası ROS oluşumunun aşırı derecede arttığını bulmuşlar ve apoptotik sperm hücre sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yükseldiğini saptamışlardır. Bu sonuçlarda fipronilin oksidatif stres aracılığıyla apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, fipronilin ROS üretimine bağlı olarak apoptoza neden olduğu insan kökenli nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y), sıçan kökenli feokromositoma hücre hattı (PC12), insekt kökenli ovaryum hücre hattı (sf9) gibi çeşitli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir.³

TABLO 2: Fipronil ile ilgili in vitro oksidatif stres çalışmaları.

Hücre hattı	İnkubasyon süresi	Doz	Amaç	Sonuç
İnsan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y)	24 saat	Fipronil (100 µM)+N-asetil sistein (NAC) (5 mM) veya+ meloksikam (40 µM)	Hücrelerde fipronil tarafından uyarılan apoptozda inflamatuvar yanıt	Fipronil aktif kaspaz-3 ve -9'u indüklemiştir. Bax'ın mitokondriyal translokasyonuna yol açmış ve Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. Ayrıca inflamatuvar yanıt meloksikam tarafından baskılanmıştır ³¹
SH-SY5Y cells	24 saat	Fipronil (10, 30, ve 100 µM)+fipronil sülfon (0.1, 1, ve 3 µM) ya da+Trolox (0.3 ve 1 µM) ya da+NAC (0.5 ve 1 mM) ya da+melatonin (0.1 ve 1 µM) ya da+tempol (0.3 ve 0.5 mM)	Fipronil ve fipronil sülfonun in vitro nörotoksitesi ve hücrelerde trolox, NAC, melatonin ve tempolün koruyucu etkisi	Fipronil ve fipronil sülfonun sitotoksitesi MDA ve NO seviyelerinde artışa yol açmıştır. Kullanılan antioksidanlardan tempol en iyi nöroprotektif etkiyi göstermiştir ⁴⁶
SH-SY5Y cells	6 ve 24 saat	Fipronil (25, 50 ve 100 µM)+N-asetilsistein (NAC) (5 mM)	Fipronil kaynaklı nörotoksiteyi önlemek için sinir hücre lerinde otofajinin rolü	Fipronil, ROS üretimini artırmış, nükleer fragmentasyonu ve yoğunlaşması için kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktif hale dönüştürmüştür. NAC, apoptoz ve otofajiyi etkili bir şekilde engellemiştir ⁴⁰
SH-SY5Y cells	6 ve 24 saat	Fipronil (100 µM)+NAC (5 mM)	Fipronil kaynaklı nöronal hücre ölümünün mekanizmaları	Fipronil ROS üretimini artırmış, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu ile MDA seviyesini artırmış ve apoptotik hücre ölümüne neden olmuştur. NAC, fipronil kaynaklı apoptotik hücre ölümünü ve ROS oluşumunu azaltmıştır ⁴²
SH-SY5Y cells	6 ve 24 saat	Fipronil (6, 13, 25, 50, 100 ve 200 µM)+NAC (5 mM)	Fipronil kaynaklı nöronal hücre ölümünün mekanizmaları	Fipronil ROS üretimine neden olarak aktif kaspaz-3 artışına ve apoptozu yol açmıştır. ROS üretimini NAC azaltmıştır ⁴²
SH-SY5Y cells	24 saat	Fipronil (100 µM)+vit. E (100 µM)+NAC (100 µM)+glukoz (25 mM)+glutamin (50 mM)+metilpruvat (50 mM)	Hücrelerde fipronil tarafından uyarılan hücre ölüm türü ve elki şekli	Glukoz, fipronil ile uyarılan Cyt c salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Fipronile maruz kalan hücrelere; E vitamini, glutamin, NAC ve metilpruvat etkilerinin hücrelerin yaşayabilirliği üzerinde bir etkisi olmamıştır ⁴⁹
PC12 cells	6 gün	Fipronil (30 ve 50 µM)+vit. C (10 µM), vit. E (10 µM) ya da+sinir büyüme faktörü (NGF) (50 ng/mL)	Fipronilin lipid peroksidasyon üzerinde etkisinin değerlendirilmesi	Fipronil, MDA seviyesini önemli ölçüde artırmıştır. E vitamini MDA seviyesini azaltmıştır. Hücrelere fipronil uygulandığında C vitamini, MDA düzeylerini azaltmıştır. NGF oksidatif strese katışı koruma sağlamıştır ⁵⁰
PC12 cells	1 ve 24 saat ya da 2, 4 ve 6 gün	Fipronil (1, 3, 10, 30 ve 100 µM)+vit. E (10 µM)	Farklılaşmamış ve farklılaşmış hücrelerde fipronilin nörotoksitesi	Fipronil MDA seviyesini azaltmıştır. E vitamini MDA seviyesini azaltmıştır ⁵¹
PC12 cells	24 saat	Fipronil (3,13, 12.5 ve 50 µM)	Fipronilin neden olduğu apoptoz ve elki şekli	Fipronil, apoptozu önemli ölçüde artırmış ve Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltmıştır ⁵²
Drosophila S2 cells	24 saat	Fipronil (20, 30, 40 ve 50 µg/mL)	Fipronilin genotoksitesi	Fipronil, ROS oluşumunu neden olarak ve Cyt c, kaspaz-3, -9 artışına, Bcl-2 seviyesinde azalmaya neden olmuştur ⁵³
Spodoptera frugiperda (Sf9) cells	48 saat	Fipronil (200 ve 400 µg/mL)	Fipronilin insektlerdeki üreme üzerine etkisi	Fipronil, ROS üretimini, özellikle OH, GSH, Na-K-ATPaz, Ca2-Mg2-ATPaz aktivitelerini artırmıştır. Cyt-c, kaspaz-3 ekspresyonunu artırmış, Bcl-2 ekspresyonunu azaltmıştır. Fipronil mitoz bölünmeyi engelleyip apoptozu yol açmıştır. ³⁸

NAC: N-asetilsistein; MDA: Malondialdehit; NO: Nitrik oksit; ROS: Reaktif oksijen türleri; NGF: Sinir büyüme faktörü; GSH: Glutayon; ATPaz: Adenozin trifosfat alpa.

TABLO 3: Fipronil ile ilgili in vitro oksidatif stres çalışmaları.

Tür	Maruz kalma süresi	Doz (Tüm dozlar vücut ağırlığına göre hesaplanmıştır)	Amaç	Sonuç
Erkek Wistar sıçanı	28 dk.	Fipronil (2,5, 5, ve 10 mg/kg)	Fipronil spermatozoa üzerindeki olumsuz etkileri	Fipronil spermatozoalarda doza bağlı olarak ROS oluşumu, lipit peroksidasyon ve apoptoza neden olmuştur ³⁶
Erkek işçi fareleri	28 gün	Fipronil (2,5, 5 ve 10 mg/kg), Fipronil (10 mg/kg)+E vit. (100 mg/kg), Fipronil (10 mg/kg)+C vit. (100 mg/kg)	Fipronil kaynaklı oksidatif strese karşı E ve C vitaminlerinin koruyucu etkisi	Fipronil yüksek dozu süperoksit dismutaz 1 (SOD1), CAT gen ekspresyonu azaltmış ve GST, SOD, CAT enzimlerinin aktivitelerini, toplam SH düzeylerini azaltmıştır. Vitamin E veya C, MDA seviyesini azaltmıştır ²⁰
Erkek işçi fareleri	28 gün	Fipronil (2,5, 5, ve 10 mg/kg) Fipronil (10 mg/kg)+vit E (100 mg/kg) Fipronil (10 mg/kg)+vit. C (100 mg/kg)	Böbrek ve beyin dokusunda fipronilin neden olduğu oksidatif strese karşı E ve C vitaminlerinin koruyucu etkisi	SOD, CAT, GSH ve total -SH antioksidan enzimlerin düzeyleri hem böbrek hem de beyin dokularında önemli derecede azalmıştır. Vitamin E veya C vitamini, MDA seviyesinde azalma sağlamıştır ⁴⁰
Kırmızı bacaklı keklik (<i>Alectoris rufa</i>)	10 gün	Fipronil eklenmemiş ve eklenmiş mısır tohumları (80:20); eklenmiş tohumlar [100 kg tohum başına 250 mL (Fipronil %50 w/v)]	Fipronil üreme performansını ve döl kalitesi üzerindeki toksik etkileri	Fipronil, MDA seviyesini azaltma eğilimi göstermiştir. Eritrositlerdeki SOD aktivitesi, maruz kalan erkek kuşlarda daha yüksek olma eğilimindedir ²¹
Sazan (<i>Cyprinus carpio</i>)	7,30 ve 90 gün	Fipronil (0-0,65 mg/L)	Fipronil içeren ticari formülasyonun pirinç tarlalarındaki <i>Cyprinus carpio</i> üzerindeki olası toksik etkileri	Fipronil balıkların tüm yaşam dönemlerinde beyin, karaciğer ve kas dokusunda TBARS seviyesini önemli ölçüde artırmıştır. Fipronil, karaciğer SOD aktivitesini artırmış ve karaciğer CAT aktivitesini inhibe etmiştir. Fipronil protein karbonil düzeyini artırmıştır ³⁵
Sazan (<i>Cyprinus carpio</i>)	60 gün	Fipronil (0,0428 mg / L)-diyet mikrobiyal Levan (%0,25, %0,50 ve %0,75 yem)	Diyet mikrobiyal levamanın fipronilin sublethal dozlarına maruz kalan <i>Cyprinus carpio</i> 'nın metabolik tepkileri üzerine etkisi	Fipronil karaciğer ve solungaçlardaki SOD aktivitesini artırmıştır. Levan; karaciğer ve solungaçlardaki SOD aktivitesini azaltmıştır ⁵⁴
Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)	24 saat	Fipronil (2, 4 ve 20 µg/L)	Zebra balığında fipronilin akut toksisitesi ve detoksifikasyon enzimleri üzerindeki etkileri	Fipronil; beyin, karaciğer, kas ve solungaç dokularında GST aktivitelerinde önemli değişikliklere neden olmazken, beyin, solungaç, karaciğer ve kas dokularındaki ECOD (Evolutionary Classification of protein Domains) aktivitelerini önemli ölçüde artırmıştır ²⁸
Erkek bufalo buzağı	98 gün	Fipronil (0,5 mg/kg /gün) +NaF (6,67 mg/kg/gün)	Fipronilin antioksidan savunması üzerine etkisi	Fipronil eritrositlerde MDA düzeyini artırmış ve kan GSH düzeyini azaltmıştır. Fipronil ve NaF maruziyelinde; lipit peroksidasyon, glutasyon peroksidasyon aktivitesi ve GSH seviyeleri üzerinde artışa neden olmuştur ⁵⁵
Bal Anısı (<i>Apis mellifera</i>)	48 saat	Fipronil (0,29 ng/arı ve 0,58 ng/arı)	Fipronil maruziyelinden sonra bal arısındaki enzim yanıtı	Fipronil, CAT aktivitesini indüklemiştir. Fipronile maruziyelinden sonra doku GST aktivitelerinde değişime olmamıştır ⁵⁶

ROS: Reaktif oksijen türleri; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; GST: Glutasyon S-transferaz; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon; TBARS: Tiyobarbitürat reaktif maddeler.

Hücre döngüsüne siklin bağımlı kinaz [cyclin-dependent kinases, (CDKs)] aracılık etmektedir.³⁹ Cdk1 kinaz; hücre bölünmesindeki interfaz aşamasının G2 evresi ile metafaz (M) (G2/M) safhasının ilerlemesinde rol oynayan siklin A ve B1'in başlıca etkileştiricisidir. ROS ürünleri, hücre bölünmesini G2/M fazında tutarak bölünmenin ilerlemesini engellemektedir.⁴⁰ sf9 hücre hattında yapılan çalışmada fipronil maruziyetinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak ROS üretimi artarak Cdk1, A ve B1 proteinlerinin ekspresyonu belirgin bir şekilde azalarak hücre bölünmesi G2/M safhasında durduğu gösterilmiştir.³⁹

FİPRONİL TOKSİSİTESİNDE HÜCRE SİNYAL YOLAKLARI

Oksidatif stres, genellikle hücre hasarına yol açan çeşitli hücre sinyal yollarını uyarmaktadır. Çekirdek reseptörlerinden olan CAR ve PXR; CYP2B, CYP3A4 gibi faz I enzimleri ve ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasından sorumlu faz II enzimlerini içermektedir. Ayrıca, omurgalılarda glutatyon s-transferaz ailesinin üyeleri gibi bazı antioksidan savunma sistemini düzenleyen birçok detoksifikasyon enzimi CAR/PXR sinyal yolağını aktifleştirerek etki göstermektedirler. Roques ve ark., CAR/PXR sinyal yolağı ile ilgili yaptıkları çalışmada; fipronilin kemirgenlerde tiroid hormon metabolizmasına bağlı olan karaciğer gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinde anahtar rol oynadığını göstermişlerdir. Fipronil maruziyetinden sonra protipik CAR/PXR, Cyp2b10 ve Cyp3a11 faz I karaciğer enzimleri ile ilgili hedef genleri uyardığını saptamışlardır.³

p38 mitojenle etkinleşen protein kinaz [mitogen-activated protein kinase (MAPK)] oksidatif stres sonucu hücrelerin çoğalmasını engelleyen ve apoptozu uyaran fosforilasyona neden olmaktadır.⁴¹ MAPK kinaz ailesine ait N-terminal kinaz [c-Jun N-terminal kinase (JNK)] ve ekstraselüler iletim düzenleyici kinaz [extracellular signal regulated kinase (ERK)], nörotransmitter madde, hormon, büyüme faktörünü içeren ekstraselüler uyarıcılar ve oksidatif stres gibi birçok strese sorumludur. MAPK ailesinin üyeleri siklooksijenaz-2 [cyclooxygenase (COX-2)]

sentezinin düzenlenmesinde ve yangı oluşumunda önemli rol oynamaktadır.³ SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmada; p38, JNK ve ERK1/2'nin fipronil tarafından uyarılan fosforilasyon seviyelerini azalttığı ve MAPK yolağının fipronil toksisitesine aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca; p38, JNK ve ERK1/2'nin inhibisyonu fipronil ile uyarılan COX-2 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bunun da MAPK yolağının fipronil kaynaklı apoptozun COX-2 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir.³⁴

p53 sinyal yolağı sinir hücrelerinin ölümündeki apoptotik sinyalleri içeren yolak olarak bilinmektedir.³ SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmada 24 saat süreyle fipronil (25, 50 ve 100 µM) maruziyetinde, bütün hücrelerde p53 aktivitesinin arttığı ve konsantrasyona bağlı olarak sitoplazmik p53 seviyesi ile nükleer p53 birikiminin arttığı saptanmıştır.^{31,32}

ROS üretiminde meydana gelen artış mitokondriden sitozole mitokondriyal sitokrom c (Cyt c)'nin salınımını artırmaktadır. Mitokondri apoptozda merkezi bir rol oynamakta ve mitokondriyal hasar şekillenince mitokondrideki Bcl-2 ekspresyonu azalır iken, sitozolden mitokondriye Bax (proapoptotik üyelerden biri) geçişi meydana gelmektedir.³¹ Kaspaz-3 apoptozda rol oynayan ve proteolizi sınırlandıran poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP)'i içeren birçok hücrel proteinin ortadan kaldırılmasında görevlidir. Ayrıca, ROS ürünleri tarafından uyarılarak apoptoz ve nekroza neden olabilmektedir.⁴² Bcl-2 ve Bax hem mitokondrinin bütünlüğünde hem de Cyt c salınımında ve kaspazların aktivasyonunun düzenlenmesinde başlıca rol oynamaktadır. SH-SY5Y hücrelerindeki fipronil (25, 50 ya da 100 µM) maruziyet çalışmalarında; konsantrasyona bağlı olarak Bax'ın mitokondriye geçişi ve Cyt c'nin salınımı belirgin bir şekilde artmış, aktif kaspaz-3, aktif kaspaz-9 ve PARP etkinliği güçlenmiş, Bcl-2 seviyesi azalmıştır. Bu bulgular; fipronilin ROS kaynaklı mitokondriyal sinyal yolağı aracılığıyla intrensek apoptozu uyardığını göstermiştir.³

Mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3 [light chain 3 (LC3)] otofajide önemli rol oynamaktadır. LC3-II formu; sitozolik

LC3-I formunun ve fosfatidiletanolaminnin konjugasyonundan oluşmakta ve otofagozomal membranın oluşmasında rol oynamaktadır.⁴³ Beclin-1; otofaji ile bağlantılı proteinler (autophagy-related gene, Atg) olarak bilinmekte ve otofaji sırasında otofagozom yapısının başlatılması için gerekmektedir.³² Park ve ark.nın SH-SY5Y hücre hattında fipronil (25, 50 ve 100 µM) maruziyeti ile ilgili yaptıkları çalışmada, LC3-II ve Beclin-1 seviyesi doza bağımlı olarak arttığı, rapamisin (100 nM) ile otofaji uyarıldığında ise aktif kaspaz-3 seviyesinin azaldığı saptanmıştır. Fakat, spesifik otofaji inhibitörü olan 3-metil adenin ilavesinde ise kaspaz-3 etkinliğinin ve fipronil ile ilgili toksik etkilerin arttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada; fipronil kaynaklı sitotoksik etkilerin otofaji tarafından değiştirildiği gösterilmiştir. Ayrıca, rapamisin otofajiyi uyardığı için fipronil kaynaklı apoptoza karşı nöroprotektif olabileceği bildirilmektedir.³⁰

Fosforil protein kinaz β (Akt β); cAMP yanıt element bağlayıcı protein ve kaspaz-9 gibi antiapoptotik proteinlerin oluşmasını uyararak ve proapoptotik proteinlerin oluşmasını baskılayarak hücrelerin sağkalımını artırmaktadır.⁴⁴ GSK3β, Akt substratının akışını fosforile etmekte ve oksidatif strese yanıt olarak meydana gelebilmektedir.⁴⁵ Nöron kökenli SH-SY5Y hücre hattında fipronil (25, 50 ve 100 µM, 24 saat) maruziyeti ile ilgili yapılan çalışmada, Ser473 (Akt1 çalışması için poliklonal antikor) üzerine Akt fosforilasyonunun ve Ser9 (GSK3β çalışması için poliklonal antikor) üzerine GSK3β fosforilasyonunun doza bağımlı olarak azaldığı saptanmıştır. Bu bulgular Akt/GSK3β yolağının; sinir hücreleri için fipronil kaynaklı oksidatif stres sonucu apoptozun uyarılmasını kontrol edebileceğini göstermiştir.³⁵

Hücre içindeki Ca'un homeostazı hücrelerde önemli fonksiyonlarda ve sayısız hücresel süreçte hayati rol oynamaktadır. Oksidatif stresin uyarılması, hücrelerin çoğalması ve sinyal iletimi gibi fizyolojik fonksiyonlar Ca²⁺'un homeostazının değişimine neden olmaktadır.⁴⁶ Ca²⁺ homeostazı bozulduğunda sitoplazmadaki serbest Ca²⁺ seviyesi artmakta ve apoptoz aracılı hücre ölümü ile

sonuçlanabilmektedir.⁴⁷ Tavares ve ark., rat karaciğer mitokondrisinde fipronil, fipronil sülfon ve fipronil desülfenil maruziyetinin doza bağımlı olarak mitokondriyal Ca²⁺'un dışarı salınımının artmasına ve apoptozu uyarmasına neden olduğunu göstermişlerdir.³³

SONUÇ

Fipronil, dünya genelinde tarım ve veteriner hekimliği alanında insektisit olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle, fipronil ve özellikle metabolitlerinin toksik etkilerini araştırmak ve böylece zararlı etkilerine karşı önlem almak gerekmektedir.³ Kullanıldığı alanlarda hem kendi hem de metabolitleri toprağa, suya ve havaya karışarak; bal arısı, suda yaşayan organizmalar ve kara av kuşları gibi hedef dışı canlılar için toksik etkilere yol açmaktadır.^{5,56} Bu etkiler daha detaylı incelenip çözüm önerileri sunulmalıdır. Memelilerde GABA_A ve GABA_C reseptörlerine bağlanabildiği için insan sağlığı üzerindeki risklerinin de değerlendirilmesi önem arz etmektedir.³² Fipronilin in vivo ve in vitro olarak ROS üretiminde belirgin artışa neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen, metabolitleri tarafından indüklenen oksidatif stresin iyi araştırılmadığı bildirilmiştir. Özellikle fipronilin ana metaboliti olan fipronil sülfonun, oksidatif strese bağlı toksisiteden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, çeşitli omurgalı ve omurgasız türlerdeki fipronil ve fipronil metabolitlerinin toksisitesi ile ilgili sinyal yollarını belirlemek ve meydana gelebilecek potansiyel riskleri öngörmek için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite

üyeliliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma tamamen yazarların kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Gripp HS, Freitas JS, Almeida EA, Bisinoti MC, Moreira AB. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). *Ecotoxicol Environ Saf* 2017;136:173-9.
- Gupta RC, Milatovic D. Fipronil. In: Gupta RC, ed. *Biomarkers in Toxicology*. 1st ed. USA: Academic Press; 2014. p.400-1.
- Wang X, Martínez MA, Wu Q, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Anadón A, et al. Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit Rev Toxicol* 2016;46(10):876-99.
- Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 2003;176:1-66.
- Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS. Environmental fate and toxicology of fipronil. *J Pestic Sci* 2007;32(3):189-99.
- Qureshi IZ, Bibi A, Shahid S, Ghazanfar M. Exposure to sub-acute doses of fipronil and buprofezin in combination or alone induces biochemical, hematological, histopathological and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat Toxicol* 2016;179:103-14.
- Ware GW, Nigg HN. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 1st ed. New York, London: Springer; 2006. p.261.
- Küçükgül ŞG, Şenkardeş S. Recent advances in bioactive pyrazoles. *Eur J Med Chem* 2015;97: 786-815.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015;22(1):5-34.
- Anadon A, Gupta RC. Fipronil. In: Gupta RC, ed. *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. 2nd ed. Oxford: Academic Press; 2012. p.604-8.
- Fung HT, Chan KK, Ching WM, Kam CW. A case of accidental ingestion of ant bait containing fipronil. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003;41(3):245-8.
- Teerlink J, Hernandez J, Budd R. Fipronil washoff to municipal wastewater from dogs treated with spot-on products. *Sci Total Environ* 2017;599:960-6.
- Chodorowski Z, Anand JS. Accidental dermal and inhalation exposure with fipronil--a case report. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004;42(2):189-90.
- Ratra GS, Erkkila BE, Weiss DS, Casida JE. Unique insecticide specificity of human homomeric $\rho 1$ GABA C receptor. *Toxicol Lett* 2002;129(1-2):47-53.
- Szegedi V, Bárdos G, Détári L, Tóth A, Banczerowski-Pelyhe I, Világi I. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology* 2005;214(1-2):67-76.
- Cravedi J, Delous G, Zalko D, Viguié C, Debrauwer L. Disposition of fipronil in rats. *Chemosphere* 2013;93(10):2276-83.
- Hainzl D, Cole LM, Casida JE. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem Res Toxicol* 1998;11(12):1529-35.
- Das PC, Cao Y, Cherrington N, Hodgson E, Rose RL. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 2006;164(3):200-14.
- Vasylieva N, Ahn KC, Barnych B, Gee SJ, Hammock BD. Development of an immunoassay for the detection of the phenylpyrazole insecticide fipronil. *Environ Sci Technol* 2015;49(16):10038-47.
- Badgujar PC, Pawar NN, Chandratre GA, Telang AG, Sharma AK. Fipronil induced oxidative stress in kidney and brain of mice: protective effect of vitamin E and vitamin C. *Pestic Biochem Physiol* 2015;118:10-8.
- Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Camarero PR, Mougeot F, Mateo R. Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environ Sci Technol* 2015;49(22): 13649-57.
- Kitulagodage M, Isanhart J, Buttemer WA, Hooper MJ, Astheimer LB. Fipronil toxicity in northern bobwhite quail *Colinus virginianus*: reduced feeding behaviour and sulfone metabolite formation. *Chemosphere* 2011;83(4):524-30.
- Peveling R, Demba SA. Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus dumerili* (Squamata: Lacertidae). *Environ Toxicol Chem* 2003;22(7):1437-47.
- Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(23):12764-7.
- Roat TC, Carvalho SM, Nocelli RC, Silva-Zacarin EC, Palma MS, Malaspina O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013;64(3):456-66.
- Cintra-Socolowski P, Roat TC, Nocelli RC, Nunes PH, Ferreira RA, Malaspina O, et al. Sublethal doses of fipronil intensify synapsin immunostaining in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) brains. *Pest Manag Sci* 2016;72(5):907-12.
- Colliot F, Kukorowski K, Hawkins D, Roberts D. Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. Paper Presented at: Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases 1992;29-34.
- Wu H, Gao C, Guo Y, Zhang Y, Zhang J, Ma E. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Pestic Biochem Physiol* 2014;115:9-14.
- Hernandez JP, Mota LC, Baldwin WS. Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation. *Curr Pharmacogenomics Person Med* 2009; 7(2):81-105.
- Park JH, Lee JE, Lee SJ, Park SJ, Park KH, Jeong M, et al. Potential autophagy enhancers protect against fipronil-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett* 2013;223(1):25-34.
- Park JH, Park YS, Lee JB, Park KH, Paik MK, Jeong M, et al. Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *J Appl Toxicol* 2016;36(1):10-23.

32. Lee JE, Kang JS, Ki YW, Lee SH, Lee SJ, Lee KS, et al. Akt/GSK3 β signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett* 2011;202(2):133-41.
33. Tavares MA, Palma ID, Medeiros HC, Guelfi M, Santana AT, Mingatto FE. Comparative effects of fipronil and its metabolites sulfone and desulfinyl on the isolated rat liver mitochondria. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015;40(1): 206-14.
34. Tashiro E, Kitagawa M, Imoto M. Apoptosis and autophagy. Osada D. *Bioprobes Biochemical Tools for Investigating Cell Function*. 2nd ed. Tokyo, Springer; 2017. p.75-113.
35. Clasen B, Loro VL, Cattaneo R, Moraes B, Lópes T, de Avila LA, et al. Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: implications for rice-fish cultivation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012;77:45-51.
36. Khan S, Jan MH, Kumar D, Telang AG. Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pestic Biochem Physiol* 2015;124:8-14.
37. Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules* 2015;5(2):472-84.
38. Wang Xq, Li Yg, Zhong S, Zhang H, Wang X-y, Qi P-p, et al. Oxidative injury is involved in fipronil-induced G2/M phase arrest and apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic Biochem Physiol* 2013;105(2):122-30.
39. Smits VA, Medema RH. Checking out the G2/M transition. *Biochim Biophys Acta* 2001;1519(1-2):1-12.
40. Ma YC, Su N, Shi XJ, Zhao W, Ke Y, Zi X, et al. Jaridonin-induced G2/M phase arrest in human esophageal cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM-Chk1/2-Cdc25C pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;282(2):227-36.
41. Watanabe T, Sekine S, Naguro I, Sekine Y, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway-dependent cytoplasmic translocation of the orphan nuclear receptor NR4A2 is required for oxidative stress-induced necrosis. *J Biol Chem* 2015;290(17):10791-803.
42. Ki YW, Lee JE, Park JH, Shin IC, Koh HC. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol Lett* 2012;211(1):18-28.
43. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Ann Rev Genet* 2009;43:67-93.
44. Yoshimoto T, Uchino H, He QP, Li PA, Siesjö BK. Cyclosporin A, but not FK506, prevents the downregulation of phosphorylated Akt after transient focal ischemia in the rat. *Brain Res* 2001;899(1-2):148-58.
45. Kim DE, Kim B, Shin HS, Kwon HJ, Park ES. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3 β and ERK1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res* 2014;327(2):264-75.
46. Kheradpezhoh E, Barritt GJ, Rychkov GY. Curcumin inhibits activation of TRPM2 channels in rat hepatocytes. *Redox Biol* 2016;7:1-7.
47. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008;27(50):6407-18.
48. Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, et al. Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: protection by antioxidants. *Toxicol Lett* 2016;252:42-9.
49. Vidau C, González-Polo RA, Niso-Santano M, Gómez-Sánchez R, Bravo-San Pedro JM, Pizarro-Estrella E, et al. Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* 2011;32(6):935-43.
50. Slotkin TA, Seidler FJ. Oxidative stress from diverse developmental neurotoxicants: antioxidants protect against lipid peroxidation without preventing cell loss. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32(2):124-31.
51. Lassiter TL, MacKillop EA, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA. Is fipronil safer than chlorpyrifos? Comparative developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. *Brain Res Bull* 2009;78(6):313-22.
52. Hu XF, Li J, Zhuang W, Li L. [Effect of fipronil on apoptosis rate and Bcl-2 of PC12 cells]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2010;28(4):264-7.
53. Zhang B, Xu Z, Zhang Y, Shao X, Xu X, Cheng J, et al. Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. *Pestic Biochem Physiol* 2015;119:81-9.
54. Gupta S, Pal AK, Sahu NP, Jha AK, Akhtar MS, Mandal SC, et al. Supplementation of microbial levan in the diet of *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil: effect on growth and metabolic responses. *Fish Physiol Biochem* 2013;39(6): 1513-24.
55. Gill KK, Dumka VK. Antioxidant status in oral subchronic toxicity of fipronil and fluoride co-exposure in buffalo calves. *Toxicol Ind Health* 2016;32(2):251-9.
56. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22(1):68-102.