

**ACEPHATE VE MEPHOSFOLAN İNSEKTİSİTLERİNİN
İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Deniz ÖZKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2009
ANKARA**

Deniz ÖZKAN tarafından hazırlanan ACEPHATE VE MEPHOSFOLAN İNSEKTİSİTLERİNİN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zekiye SULUDERE
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma ÜNAL
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN
Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Cafer Sırrı SEVİMAY
Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi

Tarih: 19 /02/2009

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orjinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Deniz ÖZKAN

ACEPHATE VE MEPHOSFOLAN İNSEKTİSİTLERİNİN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Deniz ÖZKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2009

ÖZET

Bu çalışmada, organfosofatlı insektisit olan Acephate ve Mephosfolan'ın insan lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksik etkiler kromozomal anormallikler (KA), kardeş kromatid değişimleri (KKD), mikronükleus (MN) ve comet test yöntemleri ile araştırılmıştır. Ayrıca, Acephate ve Mephosfolan'ın mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri olup olmadığı da incelenmiştir. Acephate ve Mephosfolan'ın farklı dozları (Acephate için 12,5; 25; 50; 100 ve 200 µg/ml, Mephosfolan için 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml) 24 ve 48 saat süreyle insan periferal lenfostilerine *in vitro* koşullarda uygulanmıştır. Acephate ve Mephosfolan her iki uygulama süresinde kromozom anormallik frekansında doza bağlı bir artışa neden olmuştur. Her iki insektisit en fazla meydana getirdiği kromozomal anormallik kromatid ve kromozom kırığıdır. Acephate ve Mephosfolan tüm uygulama süreleri ve dozlarda KKD/hücre ve MN frekanslarını da doza bağlı olarak artırmıştır. Her iki kimyasal mitotik indeksi doza bağlı olarak düşürmüştür. Ancak replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksini etkilememiştir. Comet testinde ise comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu kontrole göre önemli oranda artırdıkları gözlenmiştir. Bu çalışmada uygulama ve kontrol grupları arasında KA, KKD, MN ve Mİ

frekanslarında önemli düzeyde farklılıklar gözlenmesi, Acephate ve Mephosfolanın kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerinde klastojenik, mutajenik, anojenik ve sitotoksik olduğunu, ayrıca izole edilmiş lenfositlerde comet oluşumu bu kimyasalların primer DNA hasarına neden olduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048

Anahtar Kelimeler :Acephate, Mephosfolan, organofosfatlı insektisit, genotoksik etki, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet testi

Sayfa Adedi : 92

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

**THE GENOTOXIC EFFECTS OF ACEPHATE AND MEPHOSPHOLAN
INSECTICIDES IN HUMAN LYMPHOCYTES CULTURE**

(M.Sc. Thesis)

Deniz ÖZKAN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

February 2009

ABSTRACT

In this study, genotoxic effects of organophosphorus insecticides Acephate and Mephospholan were investigated using chromosomal aberrations (CA), sister chromatid exchanges (SCE), micronucleus (MN) and comet assay methods in human peripheral lymphocytes. Effects of Acephate and Mephospholan on mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index were also investigated. Different concentrations of Acephate and Mephospholan (for Acephate 12,5; 25; 50; 100 and 200 µg/ml, for Mephospholan 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 and 2,00 µg/ml) were treated to human peripheral lymphocytes *in vitro* both 24 and 48 h. Acephate and Mephospholan were significantly increased the frequency of chromosome aberrations in all treatment times in a dose dependent manner. The most common chromosomal aberration induced by both insecticides were chromatid and chromosome breaks. Acephate and Mephospholan increased SCE/cell and MN frequencies dose dependently in all treatment times and doses. Both chemicals decreased mitotic index dose dependently, however replication index and nuclear division indices were not effected. In comet assay significant increase in tail length and tail intensity was observed in treatment groups when compared with control groups. In this study significant differences in CA, SCE, MN and MI frequencies between treatment

and control groups indicated that Acephate and Mephosfolan are clastogenic, mutagenic, aneugenic and cytotoxic in cultured human peripheral lymphocytes, and also formation of comet in isolated lymphocytes showed that these chemicals caused primer DNA damage.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Acephate, Mephosfolan, organophosphorus insecticide, genotoxic effects, chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronucleus (MN), comet assay

Page Number: 92

Adviser : Asost. Prof. Dr.Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında beni her konuda destekleyen, tecrübelerini, bilgilerini benimle paylaşan, önerileri ile beni yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, laboratuvar çalıőmalarımnda yardımları ve dostukları ile her zaman yanımda olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a, Araő. Gör. Dr. Serkan YILMAZ'a, Araő. Gör. Gökçe TANER'e, laboratuvarda her aşamada desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma ve ayrıca manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalıőmanın bir bölümü, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2006-23 Numaralı projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Pestisitlerin Tarihçesi.....	2
2.2. Pestisitlerin Tanımı	3
2.3. Pestisitlerin Dünya'daki Kullanımı.....	4
2.4. Pestisitlerin Türkiye'deki Kullanımı.....	5
2.5. Pestisitlerin Çevreye Etkileri	7
2.5.1 Pestisitleri yararları.....	7
2.5.2 Pestisitlerin zararları.....	7
2.6. Pestisitlerin Sınıflandırılması	8
2.7. İnsektisitler.....	9
2.7.1. Klorlanmış hidrokarbonlar	9
2.7.2. Karbamat grubu insektisitler	9
2.7.3. Pyrethroid insektisitler	10

	Sayfa
2.7.4. Organofosfat (Organik fosfor) grubu insektisitler.....	10
2.8. Mutajenite Testleri	11
2.8.1. Kromozom Anormallikleri (KA) testi.....	12
2.8.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi	14
2.8.3. Mikronükleus (MN) testi	15
2.8.4. Comet testi	17
2.9. Acephate'ın Canlılar Üzerindeki Etkisi	19
2.10. Mephosfolan'ın Canlılar Üzerindeki Etkisi	22
2.11.Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar	23
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	26
3.1.2. Test materyali	26
3.2. Metot	28
3.2.1. İnsan lenfosit kültüründe yapılan çalışmalar	28
3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. Acephate uygulaması	36
4.2. Mephosfolan uygulaması	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ.	93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Acephate uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	37
Çizelge 4.2. Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları.....	43
Çizelge 4.3. Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	45
Çizelge 4.4. Acephate ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....	47
Çizelge 4.5. Mephosfolan uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikleri ve frekansları.....	50
Çizelge 4.6. Mephosfolan insektisitinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları.....	55
Çizelge 4.7. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfosit kültüründe mikronükleus frekansı.....	57
Çizelge 4.8. Mephosfolan ile 1 saat muamele sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....	58

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Acephate'in yapısal formülü.....	26
Şekil 3.2. Mephosfolan'ın yapısal formülü.....	27
Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dördü kardeş kromatid değişimleri.....	32
Şekil 4.1. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....	38
Şekil 4.2. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde hücre başına düşen KA frekansı.....	38
Şekil 4.3. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki KKD frekansı.....	43
Şekil 4.4. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki Mİ frekansı.....	44
Şekil 4.5. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki MN frekansı.....	46
Şekil 4.6. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu.....	47
Şekil 4.7. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu.....	48
Şekil 4.8. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı.....	51
Şekil 4.9. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde hücre başına düşen KA frekansı.....	51
Şekil 4.10. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki KKD frekansı.....	55
Şekil 4.11. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki Mİ frekansı.....	56
Şekil 4.12. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki MN frekansı.....	57

Şekil	Sayfa
Şekil 4.13. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu.....	58
Şekil 4.14. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu.....	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler.....	39
Resim 4.2. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....	44
Resim 4.3. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler.....	46
Resim 4.4. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	48
Resim 4.5. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallikler.....	52
Resim 4.6. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri.....	56
Resim 4.7. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler.....	57
Resim 4.8. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ Mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
LD ₅₀	Letal doz ₅₀
rpm	Devir sayısı
Kısaltmalar	Açıklama
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribonükleik asit
KA	Kromozomal anormallikler
KKD	Kardeş kromatid değişimi
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
Rİ	Replikasyon indeksi

1. GİRİŞ

Bugün insanlar “kimyasal maddelerin oluşturduğu” bir okyanus içinde yaşamaktadırlar. Günümüzde bilinen kimyasal maddelerin sayısının 5 milyonu aştığı ve bunların yaklaşık 70,000 adedinin de kullanılmak üzere piyasada dolaştığı tahmin edilmektedir. Bu kimyasalların belli bir grubunu oluşturan pestisitler, insan ve hayvan vücudunda, bitki üzerinde ya da çevresinde bulunan ve yaşayan, besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında besinlerin değerini azaltan, hasara uğratan zararlıları yok etmek için kullanılan bileşiklerdir.

1970’ten bu yana dünya genelinde yaklaşık 28 milyon kg pestisit etken maddesi piyasaya sunulduğu bilinmektedir. Pestisitler zirai uygulamalarla beraber halk sağlığı alanında, temizlik işlemlerinde, boya sanayisinde ve benzeri birçok uygulamada kullanılmaktadır. Bu kimyasalların kullanımı sonucunda, uygulandıkları alanda seçici toksik özellik gösterip, çevresel sorunlara neden olmaması gerekmektedir. Hedef canlıları yok etmek amacıyla yoğun ve yanlış olarak kullanılan bu bileşikler, hedef dışı canlılara yönelik toksik etkilere sebep olmakta ve bunun yansıması olarak da çevre sorunlarına yol açmaktadır. Hedef dışı canlılar, bu kimyasalları buldukları ortamdan almakta ve genetik materyal üzerinde değişimler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle söz konusu bileşiklerin farklı test sistemleri ile genotoksik açıdan değerlendirilmesi gerekmektedir.

Pestisitlerin yol açtığı genotoksik hasarın belirlenmesinde, *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan *in vitro* test sistemleri; kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleridir.

Çalışmamızda, tarım ürünlerine zarar veren böcekleri öldürmek amacıyla kullanılan organofosfatlı insektisitler olan Acephate ve Mephosfolan’ın, insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etkilerinin kromozom anormalliği, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet test sistemleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitlerin Tarihçe

Tarih boyunca insanlar, gıda kaynağı olarak kullanılan bitkileri omurgalı, omurgasız hayvanlardan ve çeşitli zararlı mikroorganizmalardan koruma çabası içinde olmuşlardır. İhtiyaçların sınırsız, buna karşılık kaynakların sınırlı olması nedeniyle önemi daha da artan tarım ürünlerinin üretilmesi ve korunması aşamalarında insanoğlu birtakım arayışlar içerisine girmiştir. Kimi zaman rastlantı, kimi zaman ise bilinçli arayışlar sonucunda elde ettikleri kimyasallar ile tarım ürünlerinin zarar verecek canlılardan korunması için çalışmışlardır. Bu amaçla bugüne kadar, günümüzde pestisit olarak adlandırılan kimyasal maddeler kullanılmış ve kullanılmaktadır. M.Ö. 1500 yıllarına ait papirüste arı, bit ve pirelere karşı pestisit hazırlandığına ve kullanıldığına dair kayıtlar bulunmuştur. Pestisit olarak kullanılan ilk maddelerin kükürt ve arsenik olduğu tahmin edilmektedir. Çinliler tarafından M.Ö. 1000 yıllarında ise fuminant olarak kullanılan sülfürün, 1800'lü yıllarda Avrupa'da fungusit olarak kullanıldığı, günümüzde de önemli bir pestisit olarak kullanılmaya devam ettiği bilinmektedir. Onaltıncı yüzyılda, Japonlar tarafından hazırlanan karışımlar, Çinliler tarafından hazırlanan arsenik içeren bileşikler, daha sonra da tütün yapraklarından elde edilen sıvı, ayrıca bakır sülfat, kireç gibi maddeler de pestisit olarak kullanılmıştır [Klassen ve ark., 2001; Dağlıoğlu, 2004; Ündeğer, 2001].

1940'lı yıllara kadar zararlı böceklerin kontrolünde kullanılan doğal bileşikler daha sonraları kararsız olmaları ve üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle yerini yapay bileşiklere bırakmıştır [Uslu ve Türkman, 1987]. Organik insektisitlerin bir kısmı, Almanya'da Schrader önderliğinde bir grup kimyager tarafından sentezlenmiş, daha sonradan toksik olduğu anlaşılmış, II. Dünya Savaşı'nda, Naziler tarafından kimyasal silah olarak kullanılmıştır. II. Dünya Savaşı'ndan sonra da organik yapıdaki pestisitlerin üretimi ve kullanımı büyük ölçüde artmıştır. Savaş koşullarının ortadan kalkması organik yapıdaki pestisitlerin silah endüstrisinden sivil endüstriye

kaymasına yol açmış buna bağlı olarak üretimi ve kullanımı büyük ölçüde yaygınlaşmıştır [Klassen ve ark, 2001; Dağlıoğlu, 2004].

Pestisitler daha sonraki yıllarda şehir yaşamında da kullanılmaya başlanmış, çeşitli böceklerin uzaklaştırılmasında, çim alanlarındaki yabancı ot ve zararlı hayvanların kontrolünde, yüzme havuzlarındaki alglerin kontrolünde, fare ve sıçanların öldürülmesinde, evcil hayvanlar için pire tozu olarak, kamp alanlarında sinek ve sivrisinek ile mücadelede kullanılmaya başlanmıştır [Sezer, 2002; Helvacı, 2003]. Kullanım alanlarının artması, başlangıçta koruyucu etkileri olduğu düşünülen pestisitlerin yararlı yönleri yanında bazı zararlarının da ortaya çıkmasına yol açmıştır. Sadece ürünleri korumaya yönelik olarak kullanılan pestisitlerin farkında olmadan ortaya çıkardığı zararlı etkiler önemli çevre sorunlarına yol açmaktadır.

2.2. Pestisitlerin Tanımı

Bitkilerde üretimi ve verimi artırmak, hastalık, zararlı ve yabancı ot yüzünden oluşabilecek kayıpları engellemek için “pestisit” adı verilen kimyasallar kullanılmaktadır [Sezer, 2002; Helvacı, 2003].

Bitkisel üretimde uygun toprak işleme, yüksek verimli ve kaliteli tohum kullanılması, uygun gübreleme ve sulama gibi verimi arttıran tüm uygulamalar yapılmış olsa dahi; kaliteli ve bol mahsul almak için zararlılar, hastalık etmeni ve yabancı otlar ile de etkili bir şekilde mücadele yapılmalıdır. Bu mücadelede en yaygın kullanılan yöntem pestisit uygulanmasıdır. Zararlılara karşı kullanılan bu kimyasallar, kullanılmadan önce daha ekonomik ve çevre sağlığına etkisinin en düşük seviyede olması için katı veya sıvı bazı yardımcı maddelerle karıştırılabilir hale getirilir. Bu fiziksel karışıma “formulasyon”, içinde belli yüzdede bulunan kimyasal maddeye “etkili/aktif madde” denilmektedir. Bu formulasyon içinde etkili madde (belli yüzdede), yardımcı maddeler, emülgatörler ve dolgu maddeler bulunmaktadır.

Bir formulasyonda olması gereken özellikler;

1. Biyolojik olarak aktif olmalı
2. Etkin olmalı
3. Kararlı bir yapıda olmalı
4. Kullanıcılar, tüketiciler ve üçüncü şahıslar açısından güvenilir olmalı
5. Besi hayvanları ve yaban hayatına zararlı olmamalı
6. Çevre için kabul edilebilir olmalıdır [Bulut ve Tamer, 1996].

Pestisitlerde istenen en önemli özellik, yok edilmesi istenen zararlıya karşı seçici ve özel toksisite göstermesi, diğer canlılara en düşük seviyede toksisite göstermesidir. Ancak her pestisit bir dereceye kadar toksisitesi vardır ve sağlık açısından “tam güvenli” bir pestisit yoktur [Barış, 2007].

Bir pestisite karşı organizmanın duyarlılığı azaldıkça, o pestisit etkinliği de düşmektedir. Başlangıçtaki etkinliği elde etmek için sürekli doz yükseltilmesi yoluna gidilmektedir. Böylece artan dozlara paralel olarak çevrede pestisit miktarı da artmaktadır. Organizmanın bu direnci kazanması iki şekilde oluşur; adaptasyon ve dayanıklılık. Adaptasyon, organizmanın genetik materyalinde değişim olmaksızın, bir kimyasal maddeye duyarlılığın azalmasıdır. Ancak dayanıklılıkta ise genetik materyalde değişim olur ve daha sonra bu değişimin geri dönüşümü olmayabilir. Buna karşılık adaptasyonda, söz konusu kimyasalın (pestisit) kullanımının ortadan kalkmasıyla organizma eski duyarlılığını tekrar kazanabilir. Bilinçsiz ve kontrolsüz kullanım, direncin daha hızlı ortaya çıkmasına yol açmaktadır [Delen ve Tosun, 1996].

2.3. Pestisitlerin Dünyadaki Kullanımı

İnsanoğlunun ihtiyaçlarındaki çeşitliliğin artışına bağlı olarak, bu ihtiyaçları karşılamaya yönelik kimyasal madde üretim miktarı artmaktadır. 1930’lu yıllarda 1 milyon ton olan kimyasal madde üretim değeri, 2000’li yıllara gelindiğinde 400 milyon tona ulaşmıştır. Bu dönem içerisinde dünya nüfusu 4 kat artarken kimyasal madde üretiminin geometrik bir artış göstererek 400 kata ulaşması düşündürücüdür.

Teknolojik gelişim, genişleyen tarım alanları ve ekolojik dengede bozulmalar gibi etmenler, bu artışın nedenleri olarak gösterilebilir. Üretilen kimyasal maddelerin yaklaşık 5 milyon tonunu pestisit grubu oluşturmaktadır. Bu pestisit grubunun %36'sı herbisit, %25'i insektisit, %10'u fungusit olup kalan %29'luk kısmını diğer pestisit grupları oluşturmaktadır [Delen ve ark., 2005].

Pestisitlerin dünya genelinde bölgesel kullanım alanları; %30 Kuzey Amerika, %25 Batı Avrupa, %16 Asya, %13 Latin Amerika, %12 Japonya, %2 Doğu Avrupa, %2 Afrika olarak dağılım göstermektedir. Görüldüğü gibi pestisitlerin %80 gibi büyük bir oranı gelişmiş ülkelerde kullanılmaktadır. Ancak başta A.B.D. olmak üzere, gelişmiş ülkelerde “düşük riskli pestisitler” ya da “doğa dostu pestisitler” kullanılmaya başlanılmış, bu yolla çevreye verilen zararların en aza indirilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla, ruhsatlandırma kolaylığı ve kullanım teşvikleri geniş ölçüde uygulamaya alınmıştır [EPA, 1999 a,b].

Başta Avrupa Birliği (AB) ülkeleri olmak üzere tüm gelişmiş ülkelerde sağlık ve çevre açısından zararlı olabilecek kimyasal ürünlere karşı önlemler alınmıştır. Örneğin, AB ülkeleri Tarım Ürünleri Çalışma Grubu, Avrupa Tarım Uygulamaları (EUROGAP) Protokolünü yürürlüğe koymuşlar ve bu protokol ile de satışa sunulan ürünlerin kullanımı sonunda herhangi bir zararı olmayacağı yönünde garanti ve güvence sağlama yoluna gitmişlerdir [Anonim, 2004].

Çevresel zararları en aza indirmeyi amaçlayan bu teşvik ve önlemler dünya üzerindeki ülkelerde farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin, gelişmiş ülkelerde alternatif üretim olanakları ile ürün çeşitliliğine gidilirken, gelişmekte olan ülkelerde bu sürecin yavaş işlenmesi, hayata geçirilecek tedbir ve önlemlerin gecikmeli olarak uygulanmasına yol açmaktadır [Delen ve Tosun, 1996].

2.4. Pestisitlerin Türkiye'deki Kullanımı

Türkiye ekonomisinde tarım sektörünün yeri toplam üretim değeri içerisinde oldukça önemlidir. Üretilen tarım ürünleri, bir yandan direkt tüketime sunulurken diğer

yandan tarıma dayalı sanayi için girdi oluşturmaktadır. Bu şekilde iki yönlü bir etkiye sahip olan tarımsal üretim, toplam ekilebilir alanın kısıtlı olması nedeniyle mevcut üretim alanlarında verimlilik artışı ile tatmin edilmeye çalışılmaktadır. Kısıtlı üretim alanları içerisinde verimliliğe dayalı bir üretim yapısının oluşturulması, üretim aşamasında ürüne zarar veren etkilerden arındırılmasıyla olanaklı olmaktadır. Tarım ürünlerinden yüksek verim alabilmek için zararlı mücadelesinde pestisitler kullanılmaktadır. Bu amaçla 2002–2008 döneminde toplam 2215 tarımsal ilaca ruhsat verilmiştir. Aynı dönemde 565 ilaç ruhsatı devir edilmiş, 163 ilaç ruhsatı ise iptal edilmiştir. Dönem sonu itibariyle ülkemizde ruhsatlı aktif madde miktarı ise 406'dır [Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü İstatistik Verileri, www.kkgm.gov.tr, 2008] .

Tarımsal ilaç ithalatının toplam kimyasal madde ithalatına oranı 2003–2004 yılları için yaklaşık on binde 2 iken, bu oran 2005 yılında on binde 6'ya yükselmiştir [Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü İstatistik Verileri, www.kkgm.gov.tr, 2008].

1960–1997 yılları arasında pestisit teknik madde ve formülasyonu için işletme izni alan tesis sayısı 68, ithalatçı firma sayısı ise 81'dir [Gedikli, 2001]. Gerek ruhsat sayısındaki artış gerekse üretim ve ithalat yapan firma sayısındaki artış, tarımsal üretim yapısı içinde verimliliği artırmaya yönelik olarak pestisit kullanımındaki artışı göstermektedir.

ABD'de veya AB'de kullanımı yasaklanmış, kısıtlanmış ya da geri çekilmiş pestisitlerin, 2002 yılı tüketimi temel alındığında, ülkemiz pestisit tüketimindeki paylarının %6,47 olduğu görülmektedir. Yine ülkemizde ruhsatlı pestisitlerden Acephate'ın, AB'deki kullanımları 2003'de durdurulmuştur [Delen ve ark., 2005] Ayrıca 01 Ocak 2009 tarihinden itibaren imalatı ve ithalatı yasaklanan aktif maddelerin arasında Mephosfolan insektistisi de bulunmaktadır. Avrupa Birliğinde'de "Out" olan ancak ülkemizde ruhsatlı bulunan 135 bitki koruma ürünü aktif maddelerinden böylece 75 adedi yasaklanmış ve 2009 yılı sonunda 6 aktif

madde, 2010 yılı sonunda ise geriye kalan 54 aktif madde de yasaklanacaktır [<http://www.zmo.org.tr/genel>].

2.5. Pestisitlerin Çevreye Etkileri

2.5.1. Pestisitlerin yararları

Pestisitlerin zirai mücadelede tarımsal alanda kullanımı ile çeşitli canlıların bu ürünlere verdiği zarar en aza indirilmeye çalışılmaktadır. Bu kullanım sonucunda elde edilen tarım ürünlerinin, hem miktarı hem de kalitesinde bir artış gözlenebilmektedir. Bu da doğal alanların tahribi sonucu oluşturulan yeni tarım arazilerine gerek duyulmayacağını düşündürmektedir. Pestisitler, insan ve hayvanları rahatsız eden ve çeşitli hastalıkların taşınmasında aracılık eden zararlılara karşı etkili mücadeleyi sağlamaktadır. Ayrıca pestisitler üretilen tarım ürünlerinde çeşitli aşamaları özellikle de depolanmaları sırasında bazı bakterilerin ve fungusların üremesini engelleyeceğinden, bu canlıların ürettiği toksinlerin yayılmasını engelleyici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir [Bulut ve Tamer, 1996; Güler ve Çobanoğlu, 1997; Vural, 2005].

2.5.2. Pestisitlerin zararları

Pestisitler, çevrede kalıcı olarak bulunmaları durumunda, yani çevreye zarar vermeyecek ikincil metabolitlere parçalanmadan ortamda kalmaları ve bu miktarların sürekli artışı sonucu canlılar üzerinde akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden olmaktadır. Bu zehirlenmelerin sonucunda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler de gözlenebilir. Bunun yanında ileriye yönelik kestirilemeyen olumsuz sonuçların doğacağı beklenilmektedir.

Pestisitlerin bilinçsiz olarak kullanımı sonucunda, ilk kullanıldığı andaki etkili sonucu alabilmek için daha sonraki uygulamalarda arttırılan kullanım miktarı veya daha etkin kimyasalların kullanımına gerek duyulması beklenen faydanın tersi bir sonuç ortaya koymaktadır. Ayrıca pestisitlerin kullanımı ile çeşitli canlıların

ortamdan uzaklaştırılmasıyla, bu canlılar ile beslenen diğer canlılarında olumsuz etkilenmelerine yol açarak besin zincirinde kırılmalara neden olmaktadır [Öztürk,1997; Anonim, 2001; Delen ve ark., 2005; Vural, 2005; Soykan, 2007].

2.6. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Tarımsal alanda zirai mücadelede ve koruma amaçlı kullanılan pestisitler çeşitli şekilde sınıflandırılabilir;

Kullanıldıkları zararlı gruba göre

- a) İnsektisitler [Böcek öldürücüler]
- b) Fungisitler [Mantar öldürücüler]
- c) Herbisitler [Yabani ot öldürücüler]
- d) Akarisitler [Örümcekleri öldürenler]
- e) Bakterisitler [Bakterileri öldürenler]
- f) Afisitler [Yaprak bitlerini öldürenler]
- g) Rodentisitler [Kemirgenleri öldürenler]
- h) Nematositler [Nematodları öldürenler]
- i) Mollusitler [Salyangoz öldürenler]
- j) Fungustatik [Mantar faaliyetini durduranlar]
- k) Algisitler [Algleri öldürenler]
- l) Avisitler [Kuşları öldüren veya kaçırınlar]
- m) Repellent [Kaçırma amaçlı]
- n) Aktraktan [Zararlı hayvanları kendine çekenler] [Güler ve Çobanoğlu, 1997].

Çalışmamızda genotoksik etkilerini incelemeyi amaçladığımız iki pestisit insektisitler grubunda yer almaktadır. Bu nedenle insektisitler kapsamlı olarak anlatılmıştır.

2.7. İnektisitler

İnektisitler formüllerine göre birkaç ana gruba ayrılmaktadırlar.

2.7.1. Klorlanmış hidrokarbonlar

Klorlanmış hidrokarbonlar, genellikle karbon-hidrojen içeren organik maddelerin (alifatik veya aromatik) klorlanmasıyla elde edilir [Gündüz, 1998]. Bu şekilde formüle edilmiş inektisitler, kimyasal stabilite ve yağda çözünürlükleri yüksek, biyotransformasyon ve yıkımları yavaş, uçucu özellikleri az olan inektisitlerdir. Diklorodifeniltrikloreten (DDT) başta olmak üzere bazı klorlu hidrokarbonlar, tarım ve sağlık programlarında uzun süreli kalıcılıkları ve diğer bileşiklere kıyasla daha az akut toksisiteye neden olmalarından dolayı yaygın olarak kullanılmışlardır. Ancak çevrede kalıcılıkları sonucu besin zincirine karışıp çevre sorunlarına yol açtıkları için kullanım alanları sınırlanmıştır [Echobichan, 1996; Marrs ve Dewhurst, 2000]

Kuşlar başta olmak üzere birçok canlıda yağ dokusunda, karaciğerde, böbreklerde, sinir sistemi gibi yağ birikimi yüksek diğer dokularda da pestisit birikimi gözlenmiş bunun sonucunda ölüme yol açtığı belirlenmiştir. Ölümle sonuçlanmayan durumlarda ise üreme sisteminde toksik etkiler meydana getirdikleri gözlenmiştir [European Commission, 1990; Preziosi, 1998].

Birçok zararlı etkilerinden dolayı organik klorlu pestisitlerin kullanımı T.C. Tarım Köyişleri Bakanlığı tarafından yasaklanmıştır. Bundan dolayı diğer inektisit gruplarından karbamatlar ve organik fosfatlı inektisitler daha yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır [Dikshith ve Raizada, 1990; Kaya ve ark., 1998].

2.7.2. Karbamat grubu inektisitler

Karbamat grubu pestisitler, karbomik asidin organik esterleri veya tuzlarıdır. Esterleşme hipotetik karbomik asit üzerindeki belli gruplar üzerinden yapılır. Karbamatlar, bazı özelliklerinden dolayı organofosfatlara benzerler fakat iki yönüyle

farklılık göstermektedirler. Birinci özellik asetil kolinesteraz enzimi ile kompleks oluşturabilen bazik özellikte bir azot grubu taşımalarıdır. Organofosfatlı insektisitlerde bu grup bazik pH'lı olmamaktadır. Bu durumda iyonize olabilecekleri için böceklerin kutikulasına ve sinirlerin kılıfına geçiş yetenekleri önemli derecede azalma göstermektedir. İkinci önemli fark ise, kolinesteraz inhibisyonu esasına dayanan etkilerinin hızlı şekilde geri dönüşümlü olmasıdır [Yavuz ve Şanlı, 1999]. Karbamat insektisitler, organik fosforlu insektisitler gibi asetil kolinesterazın inhibitörleridir. Asetilkolinesterazi inhibe ederek kolinerjik sinirlerde muskarinik ve nikotinik stimülasyona neden olurlar. Karbamat insektisitlerinin asetilkolinesteraz inhibisyonu kendiliğinden ve hızlı şekilde geri döndürme etkisi olduğu için toksik etkisi kısa sürelidir [Johnson, 1970; Lima ve ark., 1991; Taylor ve ark., 1997].

2.7.3. Pyrethroid insektisitler

Bu gruptaki insektisitlerin kullanımı, 1880'li yıllarda *Pyrethrum* cinsine ait bazı bitkilerin çiçeklerinin öğütülmesi ile elde edilen piratrum ekstratındaki pirethrin maddesinin insektisit olarak kullanılması ile başlamıştır. Prethrum ekstratındaki Pirethrin I ve II bu ekstratın %73'nü oluşturur. Doğal *Pyrethrum*'ların insektisit olarak birçok avantajları bulunmaktadır. Bu avantajları; geniş spektrumlu olmaları, memelilerde zehirliliklerinin ihmal edilebilir düzeyde olması ve doğal ortamda kısa sürede parçalanmalarıdır. Fakat üretim maliyetinin yüksek olması, üretiminin sürekli olmasındaki zorluklar doğal pyrethroidlerin kullanımını sınırlamıştır. Ticari olarak pazarlanan tüm pyrethroid etkili maddeler lipofilik olup, suda çözünebilirlikleri ve buharlaşma basınçları düşüktür. Bu özelliğinden dolayı klorlanmış hidrkarbonlar insektisit grubuna benzemektedirler. Ancak ester bağlarının hidrolizi veya oksidasyonla oldukça kolay metabolize olmalarından dolayı benzer çevre sorunlarına neden olmazlar [Ünal ve Gürkan, 2001].

2.7.4. Organofosfat (Organikfosfor) grubu insektisitler

II. Dünya Savaşı'ndan sonra tarımsal üretimde zararlılarla savaşta en önemli ilerlemeler organik fosforlu pestisitlerin üretiminde ve kullanımında olmuştur. Bu

pestisitlerin uygulanması kullanıcılara pek çok yarar sağlamıştır. Bu etkilerin ortaya çıkması ile birlikte zararlılarla mücadelede organik fosforlu insektisitler üretilmeye ve kullanılmaya başlamış ve 1980’li yılların başından itibaren kullanımı büyük ölçüde artış göstermiştir [Klassen ve ark., 2001; Dağlıoğlu, 2004; Vural, 2005].

Organik fosforlu insektisitler, fosfor atomuna çift bağ ile bağlı atomun oksijen ya da sülfür olmasına bağlı olarak sırasıyla “fosfatlar” ya da “tiyofosfatlar” diye adlandırılırlar [Ballantyne ve Marrs, 1992]. Organik fosforlu pestisitler bir grup Alman kimyacı tarafından sentezlenmişlerdir. Günümüzde kullanılan organik fosforlu bileşikler soman, sarı ve tabun gibi toksik sinir gazlarının en az 4. kuşak türevleridir [Echobichan, 1996].

Organik fosforlu pestisitler doğrudan ya da “okso”şekline metabolize olduktan sonra aktivite kazanarak asetilkolin esterazı inhibe ederler. Bu etki böceklerde ölümlerle sonuçlanırken memelilerde temas düzeyine bağlı değişen şiddette zehirlenmelere ve ölümlere yol açabilmektedir. Böcek ve memelilerde sinir uçlarında asetilkolin birikimine yol açarlar [Plestina, 1984; Lima ve ark., 1991; Echobichan,1996; Marrs ve Dewhurts; 2000].

Organofosfatlı pestisitlerin alkilleyici ajanlar oldukları bilinmektedir. Protein alkillenmesi yoluyla direkt veya indirekt olarak DNA bazlarının alkillenmesi DNA parçalanmasına sebep olmaktadır. [Rahman ve ark., 2002]. Wild (1975), organofosfatların fosforlu yapısının nükleofilik saldırılar için iyi bir substrat olduğunu göstermiştir. Bu durum DNA hasarının göstergesi olan DNA fosforilasyonunun belirteci olabilir [Wild, 1975].

2.8. Mutajenite testleri

Mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemler, periferal kan lenfositlerinde uygulanan kromozom anormalliği testi (KA), kardeş kromatid değişim testi (KKD), mikronükleus testi (MN) ve comet testidir

[Anderson, 1988; Carrano ve Natarajan, 1988; Heddle ve ark., 1991; Tucker ve ark., 1993; Hagmar ve ark., 1994; Fenech, 2002].

Çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarından elde edilen sonuçlar sitogenetik hasarların kimyasallara, iyonize ve non iyonize radyasyona maruziyet sonrası oluştuğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinin incelenmesi sonucunda bu hücrelerde de sayısal ve yapısal anormalliklerin meydana gelmiş olduğu belirlenmiştir [Tucker ve Preston, 1996; Albertini ve ark., 2000].

Sitogenetik testler kimyasalların toksisitesi sonucu oluşan hasarların kromozomal seviyede belirlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca ekolojik ve çevresel izleme değerlendirmede de kullanılmaktadır [Tucker ve Preston, 1996; Kirsch-Volders ve Fenech, 2001]. Bu değerlendirmelerde genel olarak, *in vitro* testlerde insan lenfositleri ve hücre hatları, *in vivo* testlerde ise rodent kemik iliği kullanılmaktadır [Dean ve Danford, 1984; Mateuca ve ark., 2006].

2.8.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozom anormallikleri genotoksik ajanlara maruz kalınmasından sonra ortaya çıkan önemli biyolojik sonuçlardan birisidir [Obe ve ark., 2002]. Kromozom sayısı ve yapısındaki değişimlere kromozom anormallikleri denmektedir. Kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar yapısal kromozom anormallikleridir. Poliploidi ise sayısal kromozom anormalliğidir. Bazı araştırmacılar tarafından kromozom anormalliği olarak kabul edilmeyen gap ise DNA'nın spiral çözünmesi sonucu oluşan ve boyanmayan kromozom bölgeleridir [Dean ve Danford, 1984; Natarajan, 2002; Mateuca ve ark., 2006].

Kromozom anormallik testi, memeli hücre kültürlerinde çevresel mutajenleri belirlemede en kolay ve en hassas uygulanabilen yöntemlerden biridir. Bu test hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak uygulanabilmektedir. Mesleki ya da çevresel olarak maruz kalınan genotoksik maddelerin biyolojik etkilerini değerlendirmede en fazla

kullanılan yöntemdir. Genetik hasarın boyutunu saptamaktadır. Yapısal değişimler, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilmektedir [Çakmak, 2000]. Yapılan epidomiyolojik çalışmalara göre periferik kan hücrelerinde meydana gelen kromozomal anormallik frekansı yüksek olanlarda kanser gelişim riski bulunmaktadır [Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark., 1998].

Vries adlı araştırmacı *Oenothera*'da ilk kez 1918 yılında translokasyon tipi anormalliklerin varlığını saptayarak kromozom yapısında oluşabilecek değişimleri kanıtlamıştır [Vries, 1918]. Morgan (1922) ve Bridges (1923) ise ilk kez *Drosophila*'da translokasyon ve inversiyon tipi anormallikleri gözlemlemişlerdir [Morgan, 1922; Bridges, 1923]. Disentrik ve halka oluşumu gibi kararsız anormalliklerin McClintock'un 1942'de mısırdaki yaptığı çalışmalar sonucunda, genetik materyalin kırılması, birleşmesi ve köprü oluşumu sonucu meydana geldiği saptanmıştır [Natarajan, 2002].

Yapısal kromozom anormalliklerinde eğer kromozomun tek bir kolunda kopma meydana gelirse kromatid kırılığı, eğer iki kromatidinde aynı bölgeden kırılmalar oluşuyorsa buna da kromozom kırılığı adı verilmektedir. İyonize ışınlar gibi ajanlar hücre G1 safhasında iken etki ederse kromozom tip aberasyonlar, eğer hücre G2 safhasında iken etki ederse kromatid tip aberasyonlar meydana gelebilir. İyonize ışınlar, S safhasında iken etki ederse her 2 tip aberasyon da oluşabilir [Natarajan ve Obe, 1982]. Eğer kromozomda terminal delesyon oluşmuşsa kırılan parça ilk mitozda asentrik fragment şeklinde görülmektedir. Kromozomun kromatid uçlarında meydana gelen kırılmalar sonucu iki kromatidin birleşmesi gerçekleşebilmektedir. Homolog olmayan kromozomlar arasında ise karşılıklı parça değişimi meydana gelebilir. Bu değişime de translokasyon denir. Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişiminde bir sonraki mitozda görülebilir bir değişiklik olmaz iken, asimetric parça değişiminde bir sonraki mitozda disentrik kromozom ve fragment görülebilir [Muranlı, 2006].

Gap, kromozomlarda kromatid kalınlığına eşit ya da daha dar boyanmamış (akromatik) bölgelere denmektedir. Kromozomdaki boyanmamış bölge kromatid

kalınlığından fazla ise kromatid kırığı olarak adlandırılmaktadır [Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995]. Elektron mikroskopi çalışmalarında, gap bölgelerinde DNA bağlantısının olduğu saptanmıştır [Natarajan ve Obe, 1982]. Kromozomların olması gerekenden çok fazla kısa boylu ve kalın olarak gözlenmesi ise kromozom kontraksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu olay kimyasal maddelerin histon proteinlerine etkisi olduğunu düşündürmektedir [Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995].

2.8.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun kromatidleri arasında oluşan resiprokal değişimdir. Kromozomun morfolojik yapısında herhangi bir değişim görülmemektedir. Karşılıklı değişimler kromatidlerin homolog kısımlarında oluşmaktadır [Rooney ve Czepulkowski, 1992].

KKD ilk kez 1958'de J.H. Taylor tarafından otoradyografi kullanılarak trityum işaretli bitki kromozomlarının incelenmesiyle gösterilmiştir. Zakhovov ve Egolina, 1972 yılında, 5-BromodeoxyUridin (5'-BrdU) yöntemini geliştirmişlerdir. Daha sonra Latt adlı araştırmacı ise floresan boya olan Hoechst 33258 ile kardeş kromatidlerin farklı boyandığını göstermiştir [Mader, 1997].

Kimyasal maddelerin *in vitro* etkilerini ya da maruziyet sonucu oluşan etkileri belirlemede KKD testi yaygın olarak kullanılmaktadır. KKD, DNA kırılmalarını ve yeniden birleşmelerini kapsayan homolog bölgelerdeki DNA'ların karşılıklı değişmelerini göstermektedir. Birçok çalışma mutajenlerin birçoğunun KKD frekansını arttırdığını göstermiştir [Topaktaş ve ark., 1990; Soloneski ve ark., 2001; Çelik ve ark., 2004; Feng ve ark., 2005; Aksoy ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006].

BrdU, DNA'nın yapısında bulunan timin bazının analogudur. KKD testinde kardeş kromatidleri belirlemede kullanılmaktadır. Kültür ortamına ilave edilen BrdU yeni sentezlenen DNA ipliğinde timin bazının yerine geçmektedir. Her sentezde yeni iplikte timin yerini BrdU alacaktır. Daha sonra UV ışığına maruz bırakılıp ardından

Giemsa ile boyandığında DNA'nın yapmış olduğu karşılıklı değişimler gözlenebilmektedir [Parlak, 2007]. Bazı alkilleyici ajanlar KKD'yi artırabilir fakat hiçbir etki de gözlenmeyebilir. Bu yüzden diğer sitogenetik testler ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.8.3. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleuslar (MN), hücrede mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, anafazda kutuplara çekilememiş kalgın kromozom veya asentik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır [Ford ve ark., 1988; Vanderkerken ve ark., 1989; Vanparys ve ark., 1990; Zijno ve ark. 1994]. MN testi, çeşitli kimyasalların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'ler klastojenlerin etkisiyle oluşan kromozom kırığı sonucu ayrı kalan asentik fragmentlerden ya da anöjenlerin neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşmaktadırlar [Fenech ve Morley, 1985b].

Mikronükleus ilk kez Howell tarafından eritrosit sitoplazmasında gözlenmiştir. Bu yapılara “nükleer materyal fragmenti” denmiştir. 1900'lü yılların başında ise “Howell-Jolly” olarak bilinmiştir. Benzer yapılar 1937'de Brenneke adlı araştırmacı tarafından fare ve sıçan embriyolarında, 1951 yılında ise Thoday tarafından *Vicia faba*'da gösterilmiştir [Kirsch-Volders ve ark., 2003]. Evans ve arkadaşları 1959 yılında radyasyona maruz bırakılan *Vicia faba* kök uçlarında gözlemledikleri MN'leri asentrik fragmentlerden köken aldıklarını ve mitozun son aşamasında iki yavru çekirdekten ayrılarak oluştuklarını belirtmişlerdir [Evans ve ark., 1959]. Boller ve Schmid 1970'te ve Heddle 1973'te kimyasal maddelerin genotoksitesini ölçmede kemik iliği eritrositlerinde MN oluşumlarını değerlendirmişlerdir [Boller ve Schmid 1970; Heddle, 1973]. Countryman ve Heddle 1976 yılında yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinogenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanmaya başlamışlardır [Countryman ve Heddle, 1976].

Daha sonra modifiye edilen metotlarla anöplodiye neden olan kimyasallar ile klastojeniteye neden olan kimyasalları ayırt etmek için MN büyüklük farkından yararlanılmışlardır. Klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozom fragmenti içerdiklerinden dolayı küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozom içerdiklerinden daha büyük olduğunu belirtmişlerdir [Von Leederbur ve ark., 1973; Countryman ve Heddle, 1976; Högstedt ve Karlsson, 1985]. Richard ve arkadaşları (1994) tarafından floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN'leri oluşturan kromozomların her birinin belirlenmesi sağlanmıştır [Richard ve ark., 1994].

Sitokinezi Durdurulan Mikronükleus Metodu (Cytokinesis-Blok)'nu Fenech ve Morley geliştirmiştir. Bu metot ile Cytochalosin-B (Cyt-B) hücre kültür ortamına ilave edilerek çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler elde edilmiştir [Fenech ve Morley 1985a ve 1986]. Cyt-B, sitokinez esnasında ayrılmamış çekirdekler arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkasının oluşması için gerekli olan aktin polimerizasyonunun bir inhibitörüdür [Carter, 1967]. Mikronükleuslar sadece bu sitokinezi durdurulmuş binükleer hücrelerde sayılmaktadır. Böylece hücre bölünme kinetiğinde farklılıklar olan hücre popülasyonları arasında kromozom hasarının karşılaştırılmasında güvenilir bir metot olarak kullanılmaktadır [Fenech ve Morley, 1985 a,b].

Mikronükleusların değerlendirilmesinde kullanılan ölçütler şunlardır:

- a) MN esas çekirdek ile aynı yapıda olmalıdır
- b) MN esas çekirdekten küçük olmalı ana çekirdeğin 1/16'sı ile 1/3'ü arasında bir büyüklüğe sahip olmalıdır.
- c) Ana çekirdeğe nükleoplazmik köprü ile bağlı olmamalıdır.
- d) Binükleer hücre sitoplazması içinde yer almalıdır
- e) MN esas çekirdekten ayrı, yuvarlak veya yaklaşık yuvarlak şekilde görülmelidir.
- f) Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtılmamalıdır ve nükleer kısım ile aynı renkte gözlenmelidir [Fenech, 1993].

2.8.4. Comet Testi

Genlerde DNA molekülleri ile toksik ajanların (genotoksin) etkileşmesi sonucu oluşan genotoksisiteyi belirlemede kullanılan diğer bir yöntem Comet tekniğidir.

Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet tekniği, memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit ve duyarlı bir tekniktir. Comet tekniği, genetik toksikolojide birçok alanda kullanılmaktadır [McKelvey-Martin ve ark., 1993].

DNA kırıklarının belirlenmesi ilk olarak 1978 yılında hücrelerin lam üzerinde agar gömülmesi ve DNA açılımını sağlamak için hafif alkali şartlarda liziz edilmesi ile olmuştur. Daha sonra 1984'te Ostling ve Johnson agarozda gömülen hücreleri lam üzerine yayarak yüksek tuz ve deterjanla liziz etmişler ve ardından elektroforeze tabi tutmuşlardır. Akridin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlardır. Elektroforez işlemi sonunda hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız (comet) görüntüsünün oluşmasına neden olmuştur. Bu nedenle hasarlı hücrelere "comet" adı verilmiştir [Ostling ve Johnson, 1984; Kassie ve ark., 2000].

Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen bu yöntem nötral pH'daki lizing şartları uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin edilebilmekteydi [Kassie ve ark., 2000]. Bu nedenle bu teknik daha sonra 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali koşullarda yapılarak değiştirilmiş ve sadece DNA tek sarmal kırıklarının belirlenmesini sağlayan teknik geliştirilmiştir. Bu teknik ayrıca DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış ekzisyon tamir bölgelerinin tespitinde de kullanılmaktadır [Singh ve ark., 1988].

Toksik ajanların meydana getirdiği DNA tek sarmal kırıklarının belirlenmesi için çift sarmalın açılması gerekmektedir. Bunun için de denatürasyon, çift sarmalın çözülmesi ve tek sarmal kırıklarının yanında sadece alkali ortamda açığa çıkan kırıkların (alkali labile sites) tespiti için yüksek pH'dan yararlanılmaktadır [Fairbairn

ve ark., 1995]. Nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda gözlemlendiği belirtilmiştir [Lima ve ark., 1991; Klaude ve ark., 1996; Collins ve ark., 1997; Marrs ve Dewhurst, 2000].

Singh ve arkadaşlarının modifiye ettikleri comet tekniğinde de hücreler agar gömülür ve DNA'nın denatüre olması ve hücrelerin lize edilmesi için en az bir saat kadar alkali çözeltide bekletilir. Daha sonradan DNA'nın negatif yüklü olan kırık uçları pozitif yüke doğru elektroforez işlemi boyunca göç ederler. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü gözlenir. DNA'da oluşan düşük hasarlar seviyesinde göçten çok yayılma gözlenirken, hasar artması ile DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrı gözlenir [Fairbairn ve ark. 1995].

Comet tekniğinde hasarlı hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğunur ancak DNA'da kırıklar meydana geldiğinde floresan şiddeti çekirdekten kuyruğa doğru şiddetlenir. Bu test sisteminde hasarlı hücrelerde baş kısmından kuyruğa geçiş olduğundan dolayı, DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir [McKelvey-Martin ve ark., 1993].

Comet tekniği diğer sitogenetik analiz yöntemlerine göre bir takım avantajlara sahiptir:

1. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
2. Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.
3. Hızlı sonuç elde edilebilen bir tekniktir.
4. Hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenmesini sağlamaktadır [Olive ve ark., 1990; Fairbairn ve ark., 1995].

Comet tekniğinde DNA hasarı gözle değerlendirilebildiği gibi görüntü analiz sistemleri de kullanılmaktadır.

2.9. Acephate'in Canlılar Üzerindeki Etkisi

Acephate tütünde yaprak bitine, pamukta ise pamuk yaprak piresine, lepidopterus larvasına karşı kullanılan organofosfatlı bir insektisittir [Tomlin, 2003].

Acephate kolin asterazı inhibe eden nörotoksik bir ajandır [Farak ve ark., 2000a]. Ayrıca kontak ve sistemik etkili bir insektisittir [Mahajna ve ark., 1997]. Acephate biyoaktivasyona uğradıktan sonra Methamidophos adı verilen bir başka metabolite parçalanmaktadır. Methamidophos da böceklere karşı kullanılan organofosfatlı bir insektisit olan asetilkolinesteraz inhibitörü nörotoksik bir ajandır [Poovala ve ark. 1998].

Farak ve arkadaşlarının (2000a) yaptıkları çalışmaya göre Acephate'in uygulandığı erkek farelerde 28 mg/kg/gün dozda kolinerjik etkiler gözlenmiştir. Sadece bu grupta beyin ve kaslarda asetil kolinesteraz aktivitesi önemli derecede azalma göstermiştir [Farak ve ark., 2000a].

Acephate'in histolojik ve gelişim toksisitesi gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Farak ve arkadaşları (2000b) Acephate'in erkek ratlarda sperm morfolojisine ve dokulara etkisini araştırmışlardır. Tüm uygulama dozlarında (7, 14, 28 mg/kg/gün) Acephate sperm morfolojisinde herhangi anormalliğe neden olmaz iken 14 ve 28 mg/kg/gün dozlarında sperm canlılığında ve sayısında azalma gözlenmiştir. Doz artışına bağlı olarak kas ipliklerinde de dejenerasyona neden olmuştur [Farak ve ark., 2000b].

Spasova ve arkadaşlarının (2000) yapmış oldukları bir başka çalışmaya göre Acephate ve Methamidophos enjekte edilen ratlarda 45 dakika sonra asetilkolinesteraz inhibisyonu gözlenmiş kan, karaciğer, beyin ve adrenal bezlerde ise histolojik hasara yol açmıştır. Ayrıca serumdaki aminoasit ve kan hormonlarında da değişikliğe neden olmuştur [Spasova ve ark., 2000].

Gelişim toksisitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise hamile farelere gavaj yoluyla 7, 14 ve 28 mg/kg/gün dozlarında Acephate verilmiştir. Uygulanan bu

dozlardan 28 mg/kg/gün dozunda gebeliğin 6, 15 ve 17'inci günlerinde alınan yavruların organ ağırlıklarında azalış, iskelet bozuklukları, fetal ağırlıklarında ve canlı fetus sayısında azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak Acephate'ın 28 mg/kg/gün dozunun maternal ve gelişim toksisitesine neden olduğu belirlenmiştir [Farang ve ark., 2000b].

Acephate ve metaboliti olan Methamidophos ile yapılmış genotoksisite çalışmaları da bulunmaktadır. Carver ve arkadaşlarının (1985) yaptıkları çalışmada, Acephate insektisitinin teknik formunun *in vivo* fare kemik iliğinde bulunan polikromatik eritrositlerde KKD (10, 29, 96 mg/kg), MN (11,2, 37,3, 112 mg/kg), KA (75, 150, 300 mg/kg) oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. KKD artışına neden olmadığı belirlenmiş, MN ve KA oluşumunda anlamlı artışlar elde edilememiştir. Ayrıca 20 gün boyunca 2,5 mg/kg doza maruz bırakılan maymunlarda periferik lenfositlerde KA oranının istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermediği belirlenmiştir [Carver ve ark, 1985].

Garrett ve arkadaşlarının (1986) yaptıkları çalışmada Acephate'ı da içeren 65 tane pestisit çeşitli testler ile genotoksik etkisine bakılmış olup, bu testler sonucunda Acephate genotoksik etki bakımından pozitif sonuçlar vermiştir [Garrett ve ark, 1986].

Organofosfatlı bir insektisit olan Acephate'ın *in vivo* etkisini incelemek için fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal anormallik testi kullanılmıştır. İntraperitoneal yolla farelerde 5 kez 50 mg/kg'lık dozlar 24 ve 120 saat boyunca uygulanmış, elde edilen sonuçlarda da fare kemik iliğinde kromozomal anormallik miktarında anlamlı bir artışa neden olduğu bildirilmiştir. Tüm uygulamalarda doza bağlı bir artış gözlenmiştir [Behera ve Bhunya, 1989].

Rahman ve arkadaşlarının (2002) Acephate'ın *in vivo* genotoksik etkisini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmalarında comet testi kullanılmıştır. 12,25; 24,5; 49; 98; 196 ve 392 µg/kg dozları 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle farelere oral olarak verilmiştir. Uygulamalardan sonra farelerden alınan lökositlerin canlılık düzeylerine bakılmış ve

hücre canlılığının %92 ile %96 arasında değiştiği gözlenmiştir. 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulanan tüm dozlarda comet kuyruk uzunluğunun önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. 72 ve 96 saatlik sürelerde comet kuyruk uzunluğundaki artış düşmektedir ve bu süreler boyunca hasarlı olan DNA'nın onarıldığı düşünülmektedir [Rahman ve ark, 2002].

Wang ve arkadaşları (2003) Acephate'ı içeren methoxyphosphinyl insektisitinin genotoksik etkisini belirlemede Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücre hatları kullanmışlardır. Methoxyphosphinyl insektisitinin içinde ayrıca organofosfatlı insektisit olan Dichlorvos, Monocrotophos, Methamidophos ve Trichlorfon bulunmaktadır. Bu insektisitlerin her birinin farklı dozlarının CHO hücrelerinde KKD ve KA frekansları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre KKD oluşumunu en fazla artıran insektisitler sırasıyla Acephate, Trichlorfon, Monocrotophos, Methamidophos ve Dichlorvosdur. KA testi sonuçları incelendiğinde ise Dichlorvos ve Methamidophos en fazla KA oluşumuna neden olurken Monocrotophos ve Acephate şüpheli pozitif etki göstermiş, Trichlorfon ise herhangi bir etki göstermemiştir [Wang ve ark., 2003].

Das ve arkadaşlarının (2007) Acephate insektisitinin de dahil olduğu 4 organofosfatlı insektisitinin kültüre edilmiş periferik insan lenfositlerinde genotoksitesini belirlemek için yapmış oldukları çalışmada comet test yöntemi ile apoptosis ve nekroz oluşumu incelenmiştir. 1 saat süreyle Acephate maruz bırakılan insan lenfositlerinde doza bağlı olarak (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ve 1 μ M) apoptoz ve nekroz artışı gözlenmiştir [Das ve ark., 2007].

Kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yapılan bir başka çalışmada Acephate'ın kromozomal anormalliğe ve comet oluşumları üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada doza bağlı olarak kromozom anormalliği frekansı artış göstermiştir. Comet testi sonuçlarına göre ise 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 μ m dozlarında comet kuyruk uzunluğu artış göstermiş, 8, 9 ve 10 μ m dozlarında ise nekroz oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir [Das ve ark., 2008].

Vicia faba bitkisinin kök hücrelerinde etkisi incelenen Acephate, bu bitkide kromozomlarda klastojenik ve fizyolojik etkilere sebep olmuştur [Kergommeaux ve ark, 1983].

Acephate insektisitinin metaboliti olan methamidophosun genotoksik etkisini araştırmak üzere rat kemik iliği hücrelerinde KA ve MN testi uygulanmıştır. Ratlar 2,5 ve 5 mg/kg Methamidophos'a 90 gün boyunca maruz bırakılmıştır. KA ve MN oluşumları doza bağlı olarak bir artış göstermiştir. Aynı çalışmada *Salmonella* TA98 ve TA100 suşları Methamidophos insektisiti ile muamele edilmiş ve bu suşlarda doza bağlı olarak geri mutasyonlar gözlenmiştir [Karabay ve Oğuz, 2005]

Acephate ile yapılan kromozomal anormallik, mikronükleus ve dominant lethalite testleri sonucunda CHO hücrelerinde, fare kemik iliği hücrelerinde, fare lenfoma hücrelerinde, maymun lenfoma hücrelerinde, maymun lökositlerinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir [Simmon ve ark., 1978; Jones ve ark., 1984; Jena ve Bhunya, 1994; Hour ve ark., 1998].

2.10. Mephosfolan'ın Canlılar Üzerindeki Etkisi

Mephosfolan pamukta pamuk yaprak kurdu ve pamuk yaprak biti, soyada thrips ve yaprak kurdu; mısırdaki koçan kurdu ve mısır kurduna karşı kullanılan organofosfatlı bir insektisittir.

Ticari adı Cytrolone olan Mephosfolan'ın ticari formu ile yapılan çalışmada arpa (*Hordeum vulgare* L.) tohumları 0,1; 0,01 ve 0,001 M dozları ile 2 saat süreyle ıslatma yöntemiyle muamele edilmiştir. Sonuçta, yüksek dozların düşük dozlara göre arpa kök uçlarının büyümesini engellediği gözlenmiştir. Ayrıca kök uçlarında yapılan incelemelerde doz artışı sonucunda mitotik indeks değerlerinde düşme gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu düşüşün sebebinin hücresel ATP ve cAMP miktarında azalmaya bağlı olduğu belirtilmiştir [El-Sadek ve Amin, 1985].

Mephosfolan insektisitinin canlılar üzerindeki etkisi ile ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.11. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar

Pestisitlerin genotoksik etkilerinin incelendiği çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda birçok pestisit *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde mutajenik olduğu gösterilmiştir [Balaji ve Sasikala, 1993; Bhunya ve Jena, 1993; Giri ve ark., 2002a; Bolognesi, 2003].

Organofosfatlı insektisit olan Metil parationun 0,04; 0,05 ve 0,16 mg/ml ve Kuinolfosan 0,1; 0,2 ve 0,4 µg/ml dozları insan periferel lenfositlerine uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonra incelenen lenfosit kromozomlarında sayısal ve yapısal hasarlarda artış gözlenmiştir [Rupa ve ark., 1990]. Aynı insektisit fare kemik iliği hücrelerindeki kromozomlara etkileri incelenmiş ve bu insektisit kromozomal hasarı artırdığı gözlenmiştir [Kurinny, 1975]. Bir başka çalışmada ise fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumunu artırdığı belirtilmiştir [Mathew ve ark., 1990].

Malathion insektisitinin insan lenfosit kültüründeki etkisini incelemek amacıyla KKD ve KA testi uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda bu organofosfatlı insektisit kromotit ve izokromatit gap ve yarıklara ve KKD frekansında da artışlara neden olduğu belirlenmiştir [Balaji ve Sasikala, 1993].

Organofosfatlı insektisit olan Rotenone'un genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KKD, KA ve MN testleri uygulanmıştır. Rotenone'in insan lenfositlerine *in vitro* koşullarda uygulanması sonucunda KKD ve KA frekanslarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olmaz iken, MN frekansının kontrole göre anlamlı düzeyde artışına neden olmuştur [Guadaño ve ark., 1998].

Organofosfatlı insektisitlerden Metil paration (PT), Metil paraxoan (PO) ve Dimefox (DF) bileşiklerinin karaciğer Hep G2 hücrelerinde comet testi yapılmıştır. HepG2 hücrelerinin 4 ve 24 saatlik ilaçlara maruz bırakıldıktan sonra yapılan comet testi

sonuçlarına göre, PO'ın sadece 100 µg/mL'de DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir. PT'na 4 saat maruz kalan hücrelerde 100 µg/mL'lik dozda DNA hasarı tesbit edilirken 24 saatlik maruziyet de ise 1, 10 ve 100 µg/mL'lik dozlarda DNA hasarı belirlenmiştir [Hreljac ve ark., 2008].

Metil paration insektisiti ile yapılan comet testi sonuçlarına göre bu insektisit yüksek dozlarının kültüre edilmiş insan lenfositlerinde önemli derecede DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir [Ündeğer ve Başaran, 2005].

Feng ve arkadaşlarının (2005) yapmış oldukları çalışmada Imidacloprid ve RH-5846 insektisitlerinin insan lenfositlerinde comet testi, KKD ve MN testleri yapılmıştır. KKD ve MN testlerinde en düşük dozlarda (Imidacloprid için 0,005 mg/L, RH-5846 için 5 mg/L) negatif kontrole göre herhangi bir artış göstermezken, diğer tüm dozlarda (Imidacloprid için 0,01 ve 0,5 mg/L, RH-5846 için 25 ve 100 mg/L) önemli düzeyde bir artış gözlenmiştir. Bu artış her iki pestisit için de doza bağlıdır. Comet testi sonuçlarında ise DNA hasarı artışı gözlenmiş ve bu artışında yine doza bağlı olduğu belirlenmiştir [Feng ve ark., 2005].

Malaria hastalığına karşı ilaçlamada 5 yıl boyunca çalışan işçilerde organofosfatlı bir insektisit olan Baytex-100 maruziyeti sonucu oluşabilecek genotoksik hasar araştırılmıştır. KKD frekansında artış, MI değerlerinde önemli düzeyde düşüş gözlenmiştir. KA testinde ise kromatid kırığı kromozom kırığı, halka kromozom, asentrik fragment, disentrik kromozom, gap, translokasyon ve izokromatid değişimi belirlenmiştir [Yadav ve Kaushik, 2002].

Dinocap fungusiti, insan lenfosit kültürüne 24 ve 48 saat süreyle 5, 10, 15 ve 20 ppm'lik dozlarda uygulanmıştır. Mitotik indeks bütün uygulamalarda kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır fakat replikasyon indeksinde önemli bir değişime sebep olmamıştır. Bütün doz ve uygulama süreleri anormallik oranını önemli ölçüde artırmıştır. En yaygın olarak gözlenen kromozomal anormallikler; kromatid kırığı, fragmentler, halka kromozomlar, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik

kromozomlar, kromatidlerde değişme, poliploidi ve gaptır. KKD, 48 saatlik uygulamalarda önemli ölçüde artmıştır [Çelik, 2003].

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşlarının (2006) yapmış oldukları çalışmada Afugan'ın genotoksik etkilerinin insan lenfositlerinde belirlenmesi için kromozomal anormallik, kardeş kromatilerde değişme ve mikronükleus testleri uygulanmıştır. Afugan kromozom anormallik frekansını 5, 10 ve 20 µg/ml'lik dozlarda önemli düzeyde artırmıştır. Kardeş kromatilerde değişim testi ve mikronükleus testlerinin sonuçlarına göre tüm uygulama sürelerinde (24 ve 48 saat) ve tüm dozlarda (2,5; 5; 10 ve 20 µg/ml) negatif kontrole göre artış olduğu belirlenmiştir. Tüm testlerdeki artışlar doza bağlıdır. Bu nedenle Afugan'ın insan lenfositlerinde klastojenik ve sitotoksik bir etkisi olabileceği vurgulanmıştır [Yüzbaşıoğlu ve ark, 2006].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

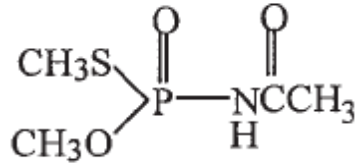
Bu araştırmada Acephate ve Mephosfolan tarafından oluşturulan genetik hasarların incelenmesi amacıyla insan periferal kanından elde edilen lenfositler kullanılmıştır. Sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi olmayan ve herhangi bir genotoksik ajana maruz kalma öyküsü bulunmayan 24–25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek bireyden kan temin edilmiştir.

3.1.2. Test materyali

Bu araştırmada test materyali olarak kullanılan Acephate (Katalog No: 30560–19–1) ve Mephosfolan (Katalog No: 950-10-7) Dr. Ehranstorfer GmbH firmasından temin edilmiştir.

Acephate

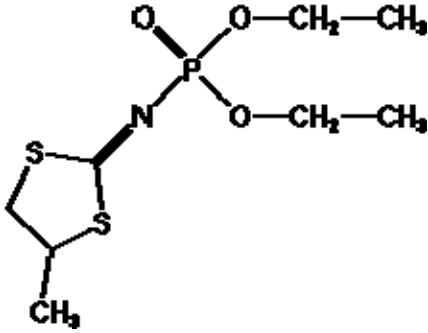
Acephate katı beyaz toz yapısında bir maddedir. Molekül formülü $C_4H_{10}NO_3PS$, kimyasal adı O,S-dimethyl acetylphosphoramidothiolate, moleküler ağırlığı 183,16 gr/mol (saflığı %99,0)'dr. Yapısal formülü aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.1. Acephate'in yapısal formülü

Mephosfolan

Kimyasal Adı: Diethyl ((*EZ*]-4-methyl-1,3-dithiolan-2-ylidene) phosphoramidate ya da (*EZ*)-2-(diethoxyphosphinylimino)-4-methyl-1,3-dithiolane. Moleküler Formülü: $C_8H_{16}NO_3PS_2$ 'dir. Yapısal formülü aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.2. Mephosfolan'ın yapısal formülü

Çalışmamızda kullanılan diğer maddeler olan; Mitomisin-C (Katalog No: 200-008-6), Kolkisin (Katalog No: 64-86-8), Sitokalasin-B (Katalog No: 14930-96-2), Bromodeoksiuridin (Katalog No: 59-14-3), NaCl (Katalog No: 7647-14-5) Sigma, EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1), DMSO (Katalog No: 67-68-5), Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) (Katalog No: 9012-36-6], Yüksek kaynama dereceli agaroz (NMA) (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog No: 1239-45-8), KCl (Katalog No: 7447-40-7) Applichem, Kromozom Medium B (Katalog No: F 5023), PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323) Biochrom firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. İnsan lenfosit kültüründe yapılan çalışmalar

Kromozom Anormalliği ve Kardeş Kromatid Değişimi Testi için Preparatların Hazırlanması

Bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 ml periferik kan, steril şartlarda 2,5 ml'lik besi ortamına ilave edilmiştir. Kan ilave edildikten sonra sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5-Bromo-2deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan her tüpe 10µg/ml olacak şekilde ilave edilmiş ve tüpler alt üst edilerek karışmaları sağlanmıştır. Ardından kültür tüpleri alüminyum folya ile sarılarak, eğik pozisyonda, 37°C' deki inkübatörde 72 saat bekletilmiştir.

Acephate için 12,5; 25; 50;100 ve 200 µg/ml, Mephosfolan için 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lık belirlenen uygulama dozları kültür tüplerine ilave edilmesi şu şekilde yapılmıştır; bu maddelerin 24 saatlik etkisini incelemek amacıyla kültür süresinin (72 saat) bitiminden 24 saat önce her bir tüpe sırasıyla dozlar ilave edilmiş, kontrol grubu olan tüpe herhangi bir test maddesi ilave edilmemiş, pozitif kontrol grubu olan tüpe ise son konsantrasyonu 0,2 µg/ml olacak şekilde mitomycin-C (MMC) eklenmiştir. 48 saatlik etki araştırması için kültür süresi bitiminden 48 saat önce aynı işlemler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüpler tekrar inkübatöre alınarak 72 saatlik toplam kültür süresinin tamamlanması beklenmiştir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe steril saf su içinde hazırlanmış kolkisin solüsyonundan 50 µl (0,06 µl) eklenmiş ve tüpler alt üst edilerek karışması sağlanmıştır. Böylece hücreler 2 saat boyunca 37°C'deki inkübatörde kolkisin ile ön işleme tabi tutulmuştur.

Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Dipte kalan 0,5–0,7 ml'lik lenfositleri içeren kısım iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, 0,075 M KCl

hipotonik solüsyonundan, otomatik karıştırıcıda damla damla ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Tüplere 5 ml hipotonik solüsyonu ilave ettikten ve homojen karışması sağlandıktan sonra tüplerin ağzı kapatılarak, 37°C’de ki etüvde 30 dakika hipotonik solüsyonunda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tüpler 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra buzdolabında soğutulmuş 3:1 metanol: asetik asitten oluşan fiksatiften 5’er ml damla damla karıştırıcıda tüplere eklenmiştir. İlk fiksatifin eklenmesiyle tüpler +4°C’de buzdolabında bir saat muamele edilmiştir. Sonra tekrar 1200 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmış, tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrar edilmiştir. Son fiksatif işleminden sonra santrifüj edilmiş ve dipte 0,5- 0,7 ml kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan kısım pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, daha önceden 1 N HNO₃ (nitrik asit)’te temizlenmiş ve %70’lik etil alkolde buzdolabında bekletilmiş olan nemli lamlar üstüne 15–20 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak hücrelerin patlaması ve kromozomların yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında ışık almayan ortamda kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus (MN) testi için preparatların hazırlanması

İnsan periferik lenfosit hücre kültürlerinin hazırlanması için steril koşullarında bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kanın 0,2 ml’si, 2.5 ml’lik kromozom medyuma ekilerek 37°C’lik sıcaklıktaki etüvde 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürdeki hücreler, MN çalışması için Acephate ve Mephosfolan’ın farklı dozları ile 48 saat muamele edilmiştir. Kültür süresi başlangıcından 24 saat sonra farklı dozlardaki insektisitlerin ekimi yapılmıştır. Kontrol grubuna hiç bir madde eklenmemiş ve pozitif kontrol için 0,2 µg/ml MMC ekimi yapılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından itibaren 44. saatte sitokinezi engellemek amacıyla 7 µl Cytochalasin-B eklenmiştir. Kültür süresi sonunda tüpler, 10 dakika 1000 rpm’de santrifüj edilmiş, ardından üstte kalan sıvı atılmıştır. Geriye kalan 0,5–0,7 ml’lik kısım karıştırıcıda homojenize edildikten sonra, tüplere 4°C’deki 0,075 KCl solüsyonundan damla damla vorteks yardımıyla 5 ml ilave edilmiş

ve ardından buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler buzdolabından çıkarıldıktan sonra 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiş, ardından üstte kalan sıvı atılmıştır. Daha sonra tüplere 5'er ml daha önceden buzdolabında soğutulmuş 3:1 metanol:asetik asitten oluşan fiksatiften eklenmiştir. Sonra tüpler 15 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi 3 kez uygulanmış ve tüpler her seferinde 5 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Son fiksatif işleminde fiksatife son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit eklenmiştir.

Son fiksatif işleminden sonra süpernatant atılmış ve tüpün dibinde kalan 0,5–0,7 ml'lik kalan kısım pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, daha önceden 1 N HNO₃ (nitrik asit)'te temizlenmiş ve %70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilmiş olan nemli lamalar üstüne 15–20 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak hücrelerin patlatılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması

Mitotik indeks, kromozomal anormallik ve mikronükleus tespiti için hazırlanan preparatlar Sorenson tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa boyama tekniği ile (pH=6,8) 15–20 dakika boyanmıştır. KKD sayımı için bir kromozoma ait kardeş kromotidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır [Speit ve Haupter, 1985]. Bu metoda göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konarak üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu (Sorensen tamponu), (pH=6,8) ile kapatılmıştır. Bu preparatlar, 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile karanlıkta 13 dakika ışınlanmıştır. Işınlama sona erdikten sonra preparatlar 60°C sıcaklıktaki 1xSSC (Sodyum klorür + Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında preparatlar Sorenson tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa ile 20–25 dakika boyanmıştır.

Her iki yöntemde de boyadan çıkarılan preparatlar, fazla boyanın akması için saf sudan geçirilerek yıkanmış ve dik şekilde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün

preparatlar DPX damlatılıp lamelle kapatılarak daimi hale getirilmiş ve bir gün kurumaya bırakıldıktan sonra mikroskopik incelemeye alınmıştır.

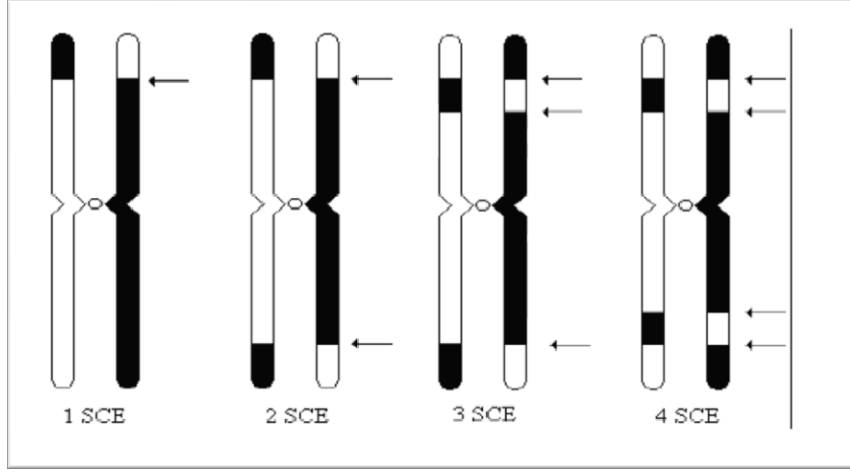
Kromozom anormalliklerinin ve mitotik indeksin belirlenmesi

Kromozomal anormalliklerin saptanmasında, her bir uygulama için kadın ve erkek bireye ait preparatlarda kromozomları iyi dağılmış olan 100'er hücre (toplam 200 hücre) değerlendirilerek kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) sayısı belirlenmiştir.

Mitotik indeksin saptanmasında, bütün uygulamalar için kadın ve erkek bireye ait preparatların her birinden 1000'er hücre olmak üzere toplam 2000 hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücreye oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks belirlenmiştir.

Kardeş kromatid değişiminin ve replikasyon indeksinin belirlenmesi

Kardeş kromatid değişimi sayısının belirlenmesinde, kadın ve erkek bireye ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre olmak üzere, her bir uygulama dozu için toplam 50 hücre incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili, üçlü ve dördü değişimler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri

Replikasyon indeksini hesaplamak için kadın ve erkek bireyden hazırlanan preparatların her birinden 100 hücre olmak üzere her uygulama için toplam 200 hücre incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) metafaz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi (RI) = $1x(M_1) + 2x(M_2) + 3x(M_3)/N$ (N = incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.

Mikronükleus frekansının ve nükleer bölünme indeksinin belirlenmesi

Sitokinezi durdurulmuş mikronükleus yöntemine göre incelenen binükleat hücre, sitoplazma bölünmesi engellendiğinden dolayı ortak sitoplazmaya sahip iki yeni çekirdekli hücre olarak meydana gelir. Mikronükleus tespiti bir kez bölünen ve iki çekirdek taşıyan bu hücrelerde (binükleat hücre) yapılmaktadır. Daha önceden hazırlanıp daimi hale getirilmiş preparatlarda her bir doz ve süre için erkek ve dişi donörde toplam olarak 2000 binükleat hücrede mikronükleus frekansları belirlenmiştir.

Binükleat hücrelerde bir kez daha bölünme geçirilirse aynı sitoplazma içerisinde üç çekirdek bulacaktır. Binükleat hücrelerde ki iki çekirdeğin ikisi de ikinci mitozu geçirirlerse aynı sitoplazma içinde dört çekirdekli bulunacaktır. Nükleer bölünme indeks sayımları yapılırken hiç bölünme geçirmeyen hücreler N_1 , iki çekirdekli

hücreler N_2 , üç çekirdekli hücreler ise N_3 , dört ve daha fazla çekirdeğe sahip hücreler ise N_4 olarak sayılarak belirlenmiştir. Nükleer bölünme indeksi belirlenirken her bir donörde 500 hücre sayılmış ve $1xN_1+2xN_2+3x(N_3+N_4)/N$ formülünden yararlanılarak 1, 2, 3 ve 4 çekirdekli hücrelerin sayısına göre nükleer bölünme indeksi tespit edilmiştir.

3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Comet testi

Comet testi Singh ve ark.'nın (1988) yaptığı çalışmalar dikkate alınarak ve bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir [Singh ve ark., 1988]. Comet test tekniğinde de her bir pestisitinin etkisini incelemek amacıyla bir bayan ve bir erkek bireyden alınan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Heparinli enjektörle alınan periferik kan içerisinde 1'er mL PBS bulunan ependorflara 100'er μ l eklenmiş, alt üst edilmiş ve 10 dak. buz dolu kaptaki bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda her bir ependorfun dip kısmına 100'er μ l lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenmiş ve 4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorfların üst kısmında gözlenen bulutsu kısmın 100'er μ l'si dikkatlice alınarak diğer ependorf tüpe aktarılmıştır. Daha sonra stok haline getirilmiş izole lenfositlerin 100'er μ l'si kullanılacak her bir doz için ayrı ependorflara alınmıştır.

Ayrı ependorflara alınan lenfositler, Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin çeşitli dozları (Acephate için 12,5; 25; 50; 100 ve 200 μ g/ml, Mephosfolan için 0,125; 0,25; 0,50; 1,00 ve 2,00 μ g/ml) ile muamele edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol ve herhangi bir kimyasal uygulanmamış negatif kontrol oluşturulmuştur. 37 °C'de 1 saat inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrasında ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılmış ve her bir doz için 100'er μ l PBS ilave edilip tüpler dikkatlice alt üst edilmiştir. Daha önceden hazırlanan düşük kaynama dereceli agarın (%0,65'lik) 75 μ l'si ependorflardaki, 100 μ l lenfositlerle karıştırılıp daha önceden üzeri yüksek kaynama dereceli agar (%0,65'lik) ile kaplanan lamların

üzerine damlatılmış ve lamaların üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar 15–20 dak. buzdolabında bekletilmiştir.

Süre sonunda lamaların üzerindeki lameller dikkatlice kaldırılmış ve içerisinde liziz çözeltisi (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH=10 içeren solüsyonun 89 ml'sine 10 % DMSO ve 1% Triton X-100 ilave edilmiştir) bulunan şaleler içerisine konulmuş ve 1 saat buzdolabında (+4°C) bekletilmiştir. Liziz çözeltisinde bekletildikten sonra lamalar dikkatlice alınmış ve içerisinde elektroforez tamponu (300 mM NaOH, 1mM EDTA pH>13) bulunan tanka yerleştirilmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. Bu bekleme süresinin amacı DNA sarmalının çözülmesini sağlamaktır. Süre sonunda 25 V 300 mA'da 20 dakika elektroforez yapılmıştır. Böylece hasarlı DNA'nın anoda doğru göçmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra lamalar dikkatlice elektroforez tankından çıkarılarak nötralizasyon tamponu (0,4 M Tris, pH=7,5) bulunan şalelere konulmuştur. Bu işlem beşer dakika arayla üç kez yapılmıştır. Nötralizasyon işlemi sonucunda lamlara flörens renk vermesi amacıyla 20 µg/ml'lik etidyum bromürün 50 µl'si damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Boyamaya alınan preparatlar +4 °C'de 10–15 dakika bekletilmiştir. Yapılan tüm işlemler çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Görüntü analizi ve comet sayımı

Etidyum bromür ile boyanmış olan preparatlar Olympus marka flörsan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filitreli) altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan her bir kimyasal için her bir donörden 100'er Comet olmak üzere toplam 200 Comet "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., UK analiz sistemi kullanılarak sayılmış ve sonuçlar kuyruk yoğunluğu (%) ve kuyruk uzunluğu olarak belirlenmiştir.

İstatiksel analizler

Deney gruplarındaki mitotik indeks, replikasyon indeksi, nükleer bölünme indeksi, kromozomal anormallikler ve mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z-testi kullanılırken, kardeş kromatid değişimleri ve comet değerlendirilmesinde t-testi kullanılmıştır.

Yapılan çalışmada, mitotik indeks, replikasyon indeksi, KKD/Hücre sayısı, anormal hücre frekansı, KA/Hücre sayısı, MN/Hücre sayısı, nükleer bölünme kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu indeksi için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Acephate Uygulaması

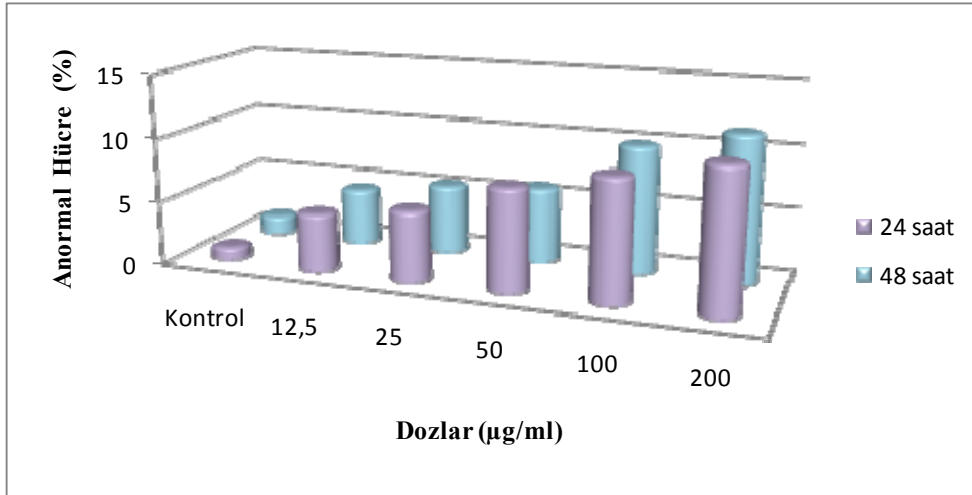
Acephate'in farklı dozlarının 24 ve 48 saat boyunca insan lenfositleri ile muamele edilmesi sonucunda gözlenen KA tipleri ve sayısı ile hücre başına düşen kromozom anormalliği frekansı ve anormal hücre yüzdesi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Acephate insektisiti uygulanması ile insan lenfosit kültürlerinde toplam 6 tip yapısal ve tek tip sayısal anormalliğin olduğu saptanmıştır. Bunlardan yapısal anormallikler kromatid (% 84) ve kromozom kırıkları (% 9,6), kardeş kromatidlerde birleşme (% 2,6), fragment (% 1,9) ve kromatid değişimi (% 0,6)'dir. Poliploidi (% 1,3) ise sayısal olarak meydana gelen anormalliktir (Resim 4.1.). Bu anormalliklerden en sık rastlanılanlar kromatid ve kromozom kırıklarıdır. Kromozomal anormallik testinde anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin hesaplanması ile elde edilen sonuçlara göre kullanılan kimyasalın klastojenitesinin değerlendirilmesini sağlamaktadır. Yapılan analizler anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin frekansının kontrole göre tüm doz ve sürelerinde istatistiksel olarak önemli oranda ($p < 0,001$) arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r = 0,92$, 48 saatlik uygulamada $r = 0,95$) (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.) (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. Acephate uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

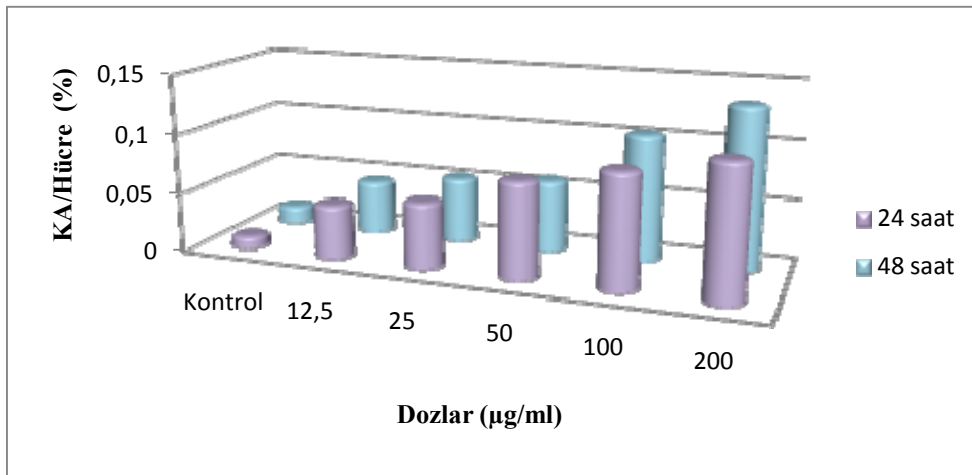
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)	ktk	Kzk	f	kcb	dis	kd	P		
Kontrol	24	-	2	-	-	-	-	-	-	1,00±0,703	0,010±0,007
MMC	24	0,20	23	9	1	6	-	6	-	22,50±2,953	0,255±0,031
Acephate	24	12,5	6	1	1	-	-	-	1	4,50±1,466*	0,045±0,015*
	24	25	10	1	-	-	-	-	-	5,50±1,612*	0,055±0,016*
	24	50	13	2	1	-	-	-	-	8,00±1,918*	0,080±0,019*
	24	100	15	1	-	1	-	1	1	9,50±2,073*	0,095±0,021*
	24	200	17	4	-	1	-	-	-	11,00±2,212*	0,110±0,022*
Kontrol	48	-	3	-	-	-	-	-	-	1,50±0,860	0,015±0,008
MMC	48	0,20	45	13	13	4	2	19	-	35,50±3,384	0,470±0,353
Acephate	48	12,5	9	-	1	-	-	-	-	4,50±1,466*	0,045±0,014*
	48	25	10	-	1	-	-	-	-	5,50±1,612*	0,055±0,016*
	48	50	12	-	-	-	-	-	-	6,00±1,679*	0,060±0,017*
	48	100	18	3	-	-	-	-	-	10,00±2,121*	0,105±0,022*
	48	200	21	3	-	2	-	-	-	11,50±2,212*	0,135±0,024*
Kromozomal anormallik yüzdesi			%84	%9,6	%2,6	%1,9		%0,6	%1,3		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kcb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik, kd: kromatid değişimi, p: poliploidi

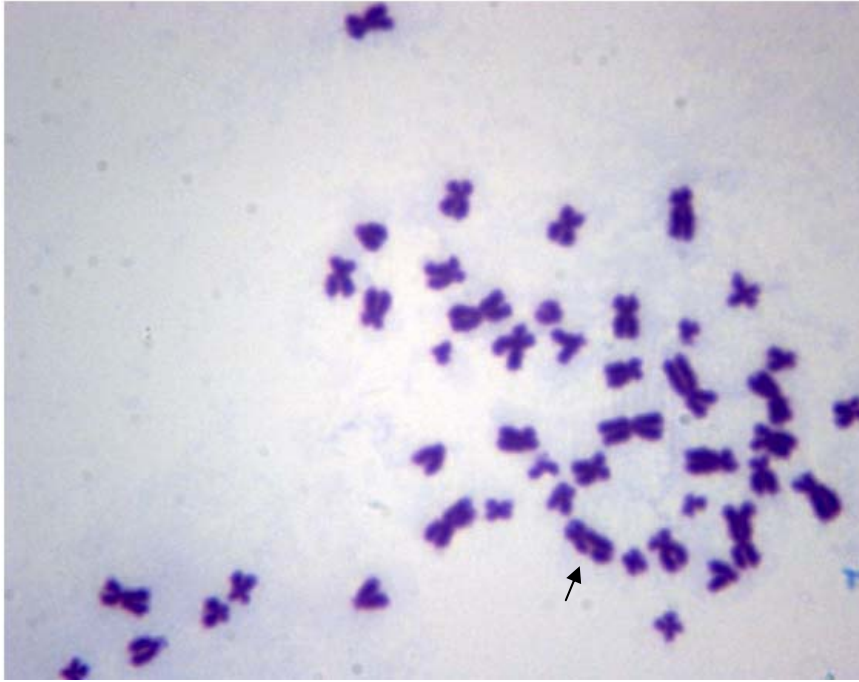
*Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



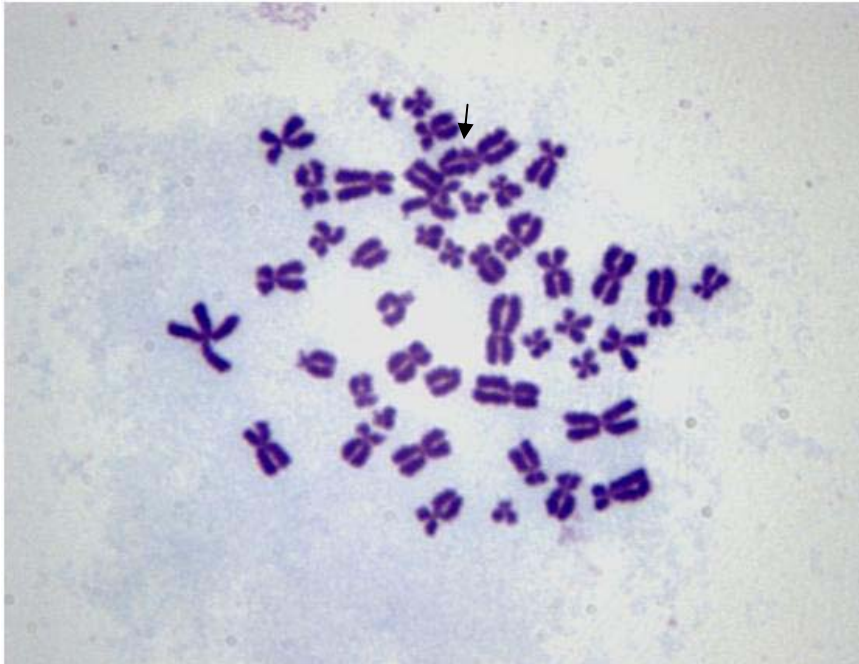
Şekil 4.1. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı



Şekil 4.2. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı



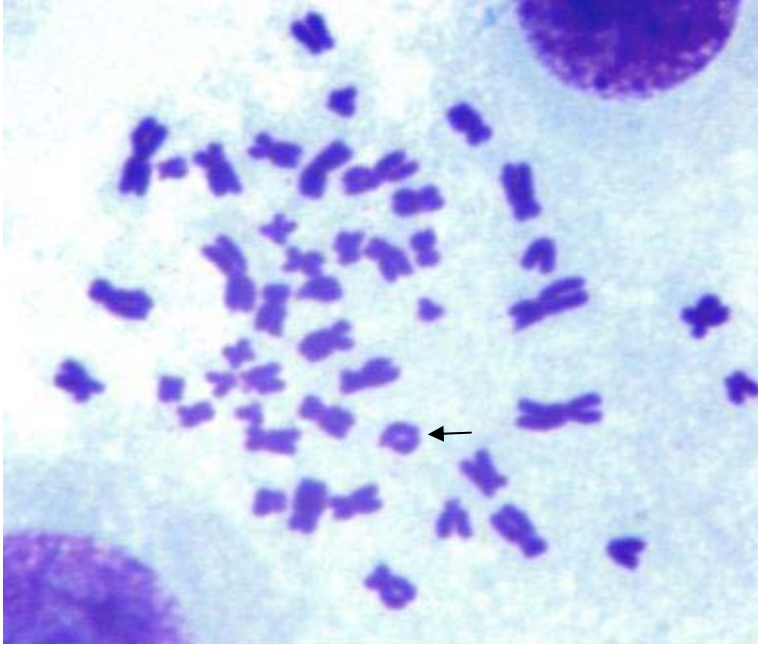
(a)



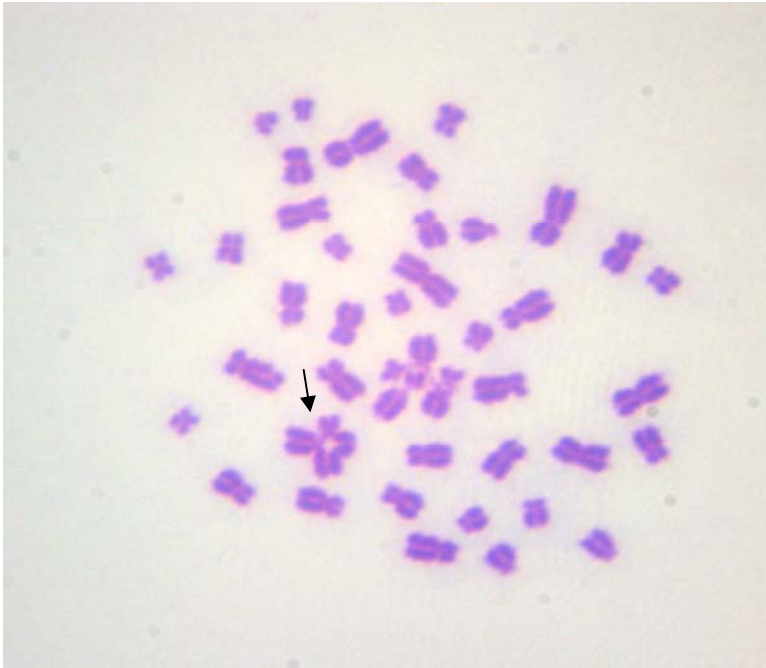
(b)

Resim 4.1. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri

- a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı
- c) kardeş kromatidlerde birleşme d) kromatid değişimi
- e) fragment f) poliploidi



(c)

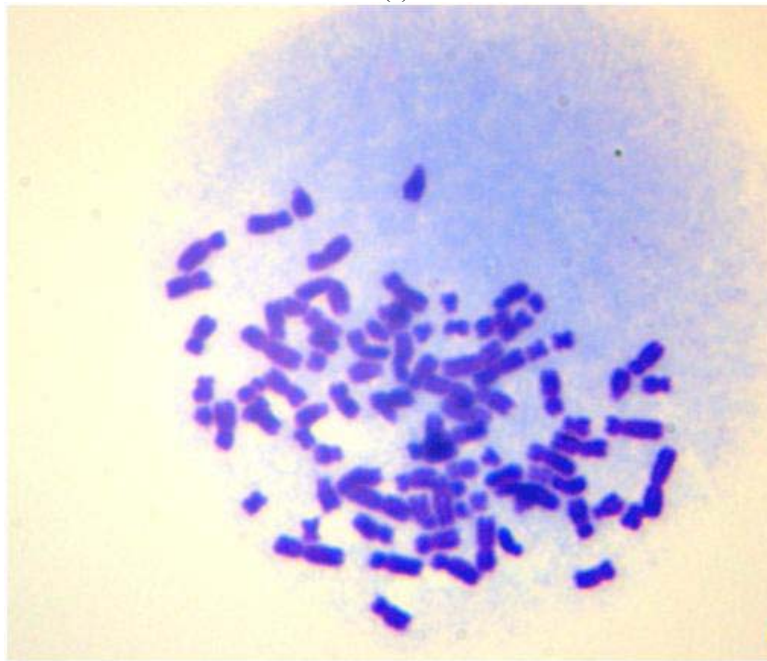


(d)

Resim 4.1. (Devam) Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri
a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı
c) kardeş kromatidlerde birleşme
d) kromatid değişimi e)fragment f) poliploidi



(e)



(f)

Resim 4.1. (Devam) Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri
a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı
c) kardeş kromatidlerde birleşme
d) kromatid değişimi e) fragment f) poliploidi

Kardeş kromatid değişimi test yönteminde kardeş kromatidler arasında kimyasalın etkisi ile oluşan karşılıklı parça değişimlerinin miktarı belirlenmektedir. Her bir doz ve muamele süresi için ikinci mitoz geçiren iyi dağılmış 50 metafaz hücresi incelenerek kardeş kromatidlerdeki parça değişimleri sayılmıştır. Kardeş kromatid değişim frekansı 24 saatlik uygulamada 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise 12,5 µg/ml doz hariç diğer dozlarda kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda bir artış göstermiştir ve bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,69$, 48 saatlik uygulamada $r=0,87$) (Çizelge 4.2., Şekil 4.3., Resim 4.2.). Acephate'ın neden olduğu kardeş kromatidlerdeki minimum seviyedeki parça değişim miktarı 2 iken maksimum seviyedeki parça değişimi ise 22'dir.

Mitotik indeks 24 saatlik uygulamada 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında, 48 saatlik uygulamada ise 12,5 µg/ml doz hariç tüm dozlarda kontrole göre doza bağlı düşüş göstermiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4) (24 saatlik uygulama için $r=-0,94$, 48 saatlik uygulama için $r=-0,92$). Yapılan çalışmalarda Acephate insektisitinin replikasyon indeksi üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

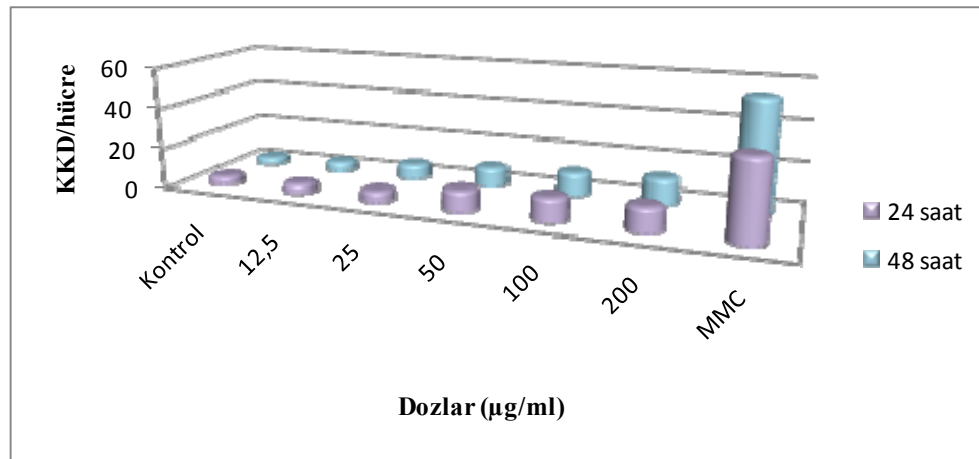
Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süresi (saat)	Dozlar (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	1-8	4,36±0,26	33	50	117	2,42±0,05	11,00±0,41
MMC	24	0,2	20-56	38,30±1,30	82	68	50	0,74±0,09	5,00±0,49
Acephate	24	12,5	6-13	4,64±0,27	41	41	118	1,77±0,07	10,35±0,68
	24	25	4-19	5,60±0,32	40	48	112	2,36±0,05	9,75±0,66
	24	50	5-17	10,38±0,56a	32	42	126	2,47±0,04	8,50±0,62**
	24	100	6-18	11,60±0,50a	34	43	123	2,44±0,04	7,65±0,59***
	24	200	8-19	12,00±0,39a	21	33	146	2,62±0,05	6,55±0,55***
Kontrol	48	0,00	2-7	3,64±0,24	18	64	128	2,48±0,05	11,93±0,72
MMC	48	0,2	25-83	54,32±2,36	104	50	46	1,71±0,06	4,00±0,44
Acephate	48	12,5	2-19	4,90±0,29	45	52	103	2,30±0,05	10,35±0,68
	48	25	2-13	7,42±0,37a	31	85	84	2,26±0,05	9,50±0,65*
	48	50	7-14	9,74±0,34a	35	77	89	2,80±0,06	8,00±0,61***
	48	100	6-19	11,20±0,60a	25	47	128	2,51±0,03	7,15±0,58***
	48	200	8-22	12,58±0,44a	32	49	119	2,68±0,04	6,15±0,54***

a Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

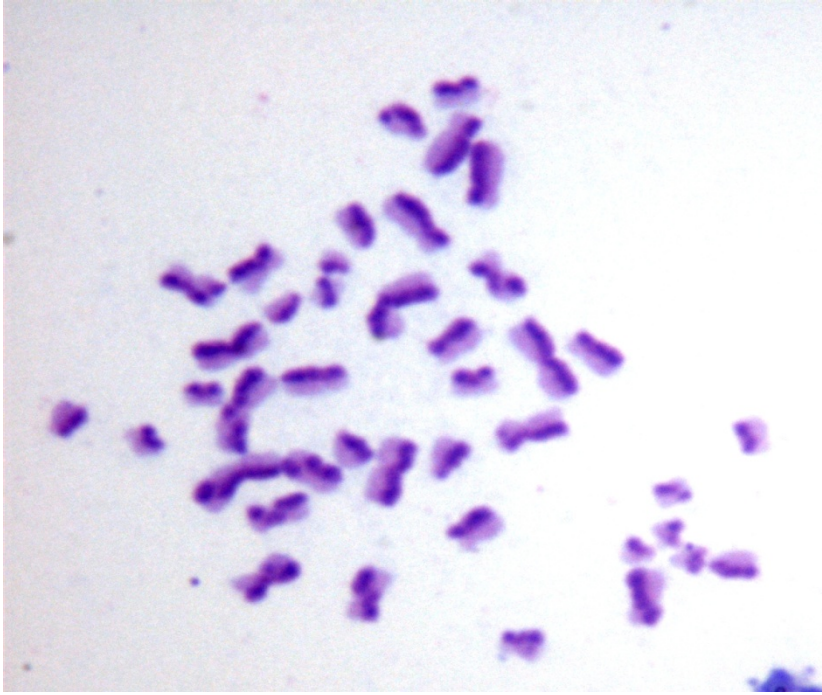
* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

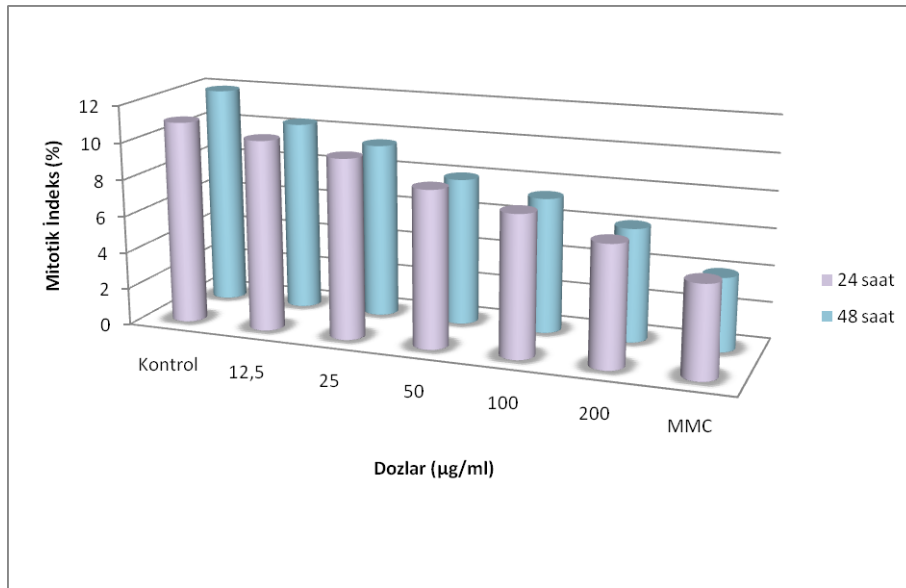
*** Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.3. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki kardeş kromatid değişim frekansı



Resim 4.2. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri



Şekil 4.4. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks değerleri

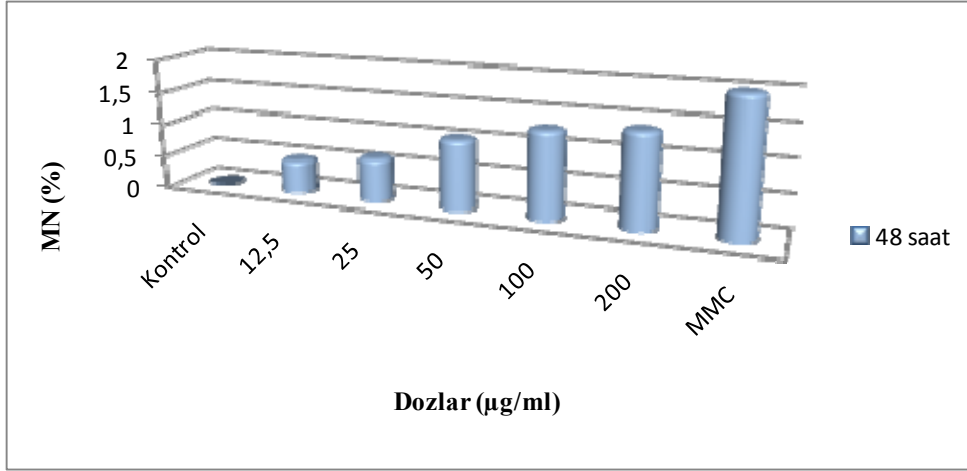
Bu çalışmada uygulanan diğer bir genotoksisite testi mikronükleus testidir. Çizelge 4.3.'te Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde MN frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi verilmiştir. Bu testte MN bulunduran hücrelerin binükleat hücrelere yüzde cinsinden oranları analiz edilmiştir. Acephate insektisitinin uygulamasıyla kültüre alınmış insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları kontrole göre tüm uygulamalarda doza bağlı olarak önemli oranda (12,5 ve 25 µg/ml dozlarda $p<0,01$; 50, 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda $p<0,001$) artış göstermiştir ($r=0,87$) (Çizelge 4.3., Şekil 4.5.). Acephate uygulanması sonucunda binükleat hücreler içerisinde birli, ikili ve dörtlü mikronükleuslara rastlanmıştır (Resim 4.3.). Ayrıca Acephate insektisitinin nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

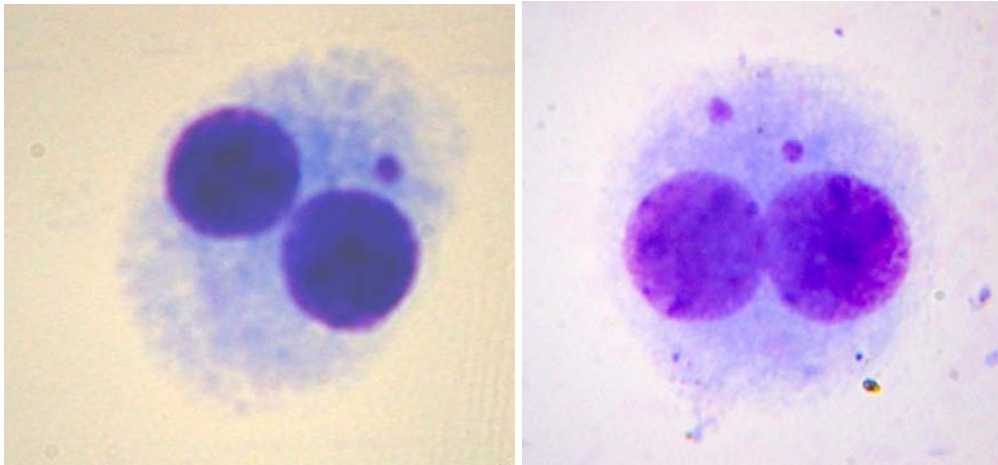
Test maddesi	Treatment		Sayılan binükleat hücre sayısı	Binükleat hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBİ)
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0,00	2000	-	-	-	-	0,00±0,00	2,02±0,314
MMC	48	0,20	2000	38	2	-	-	2,00±0,31	0,71±0,188
Acephate	48	12,5	2000	10	-	-	-	0,50±0,16*	1,99±0,312
	48	25	2000	13	-	-	-	0,65±0,18*	1,91±0,306
	48	50	2000	15	1	-	1	1,05±0,23**	1,74±0,292
	48	100	2000	20	3	-	-	1,30±0,25**	1,87±0,302
	48	200	2000	22	3	-	-	1,40±0,26**	1,91±0,306

* Kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

** Kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

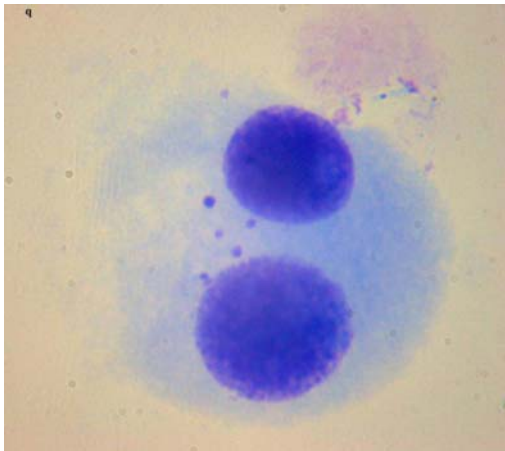


Şekil 4.5. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



(a)

(b)



(c)

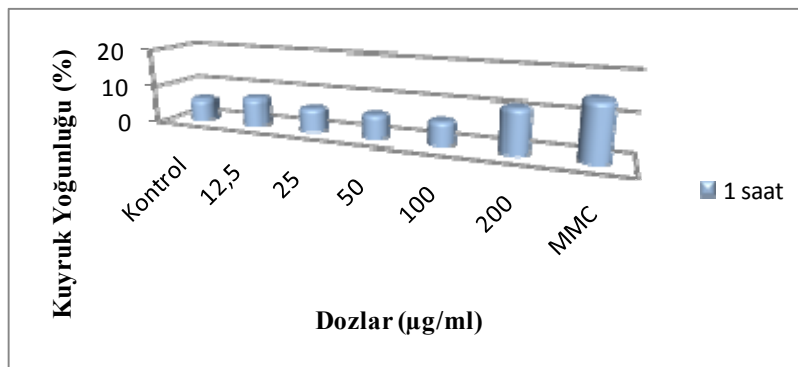
Resim 4.3. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler
a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus c) beş mikronükleus

Bu çalışmada uygulanan diğer bir genotoksisite testi comet testidir. Çizelge 4.4.'te Acephate ile muamele sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı gösterilmektedir. Uygulama süresinin sonunda her bir dozdan 100 hücre sayılarak DNA hasarını belirlemek üzere incelenmiştir. Bu test sisteminde hücrelerdeki DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri dikkate alınmıştır. Acephate insektisiti comet kuyruk yoğunluğunu ve comet kuyruk uzunluğunu kontrole göre tüm dozlarda artırmıştır. Bu artış kuyruk yoğunluğunda yalnızca en yüksek doz olan 200 µg/ml'lik dozda anlamlı bulunurken, kuyruk uzunluğunda 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda anlamlı bulunmuştur. Kuyruk uzunluğundaki artışın doza bağlı olduğu belirlenmiştir ($r=0,94$) (Çizelge 4.4., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.).

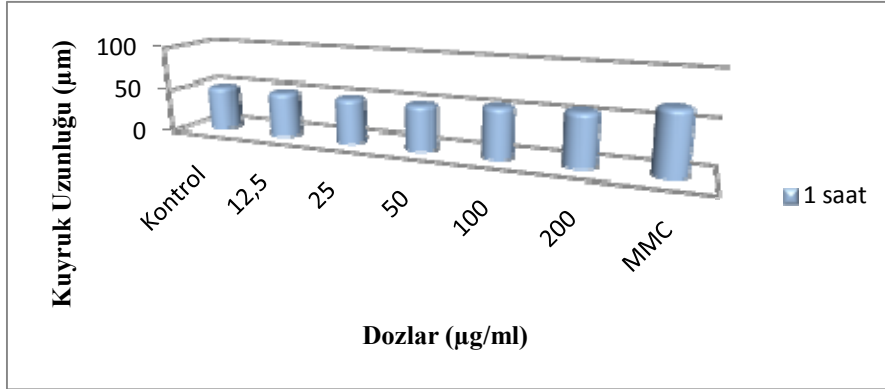
Çizelge 4.4. Acephate ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk yoğunluğu (%)
Kontrol	0,00	50,83±0,90	5,81±0,67
Acephate	12,50	50,33±0,81	7,46±1,04
	25,00	50,03±0,90	6,37±0,84
	50,00	49,72±0,69	6,30±0,74
	100,00	55,12±1,29*	6,24±0,67
	200,00	57,45±1,56*	11,30±1,48*
Pozitif Kontrol	0,30	68,65±1,97	14,45±1,64

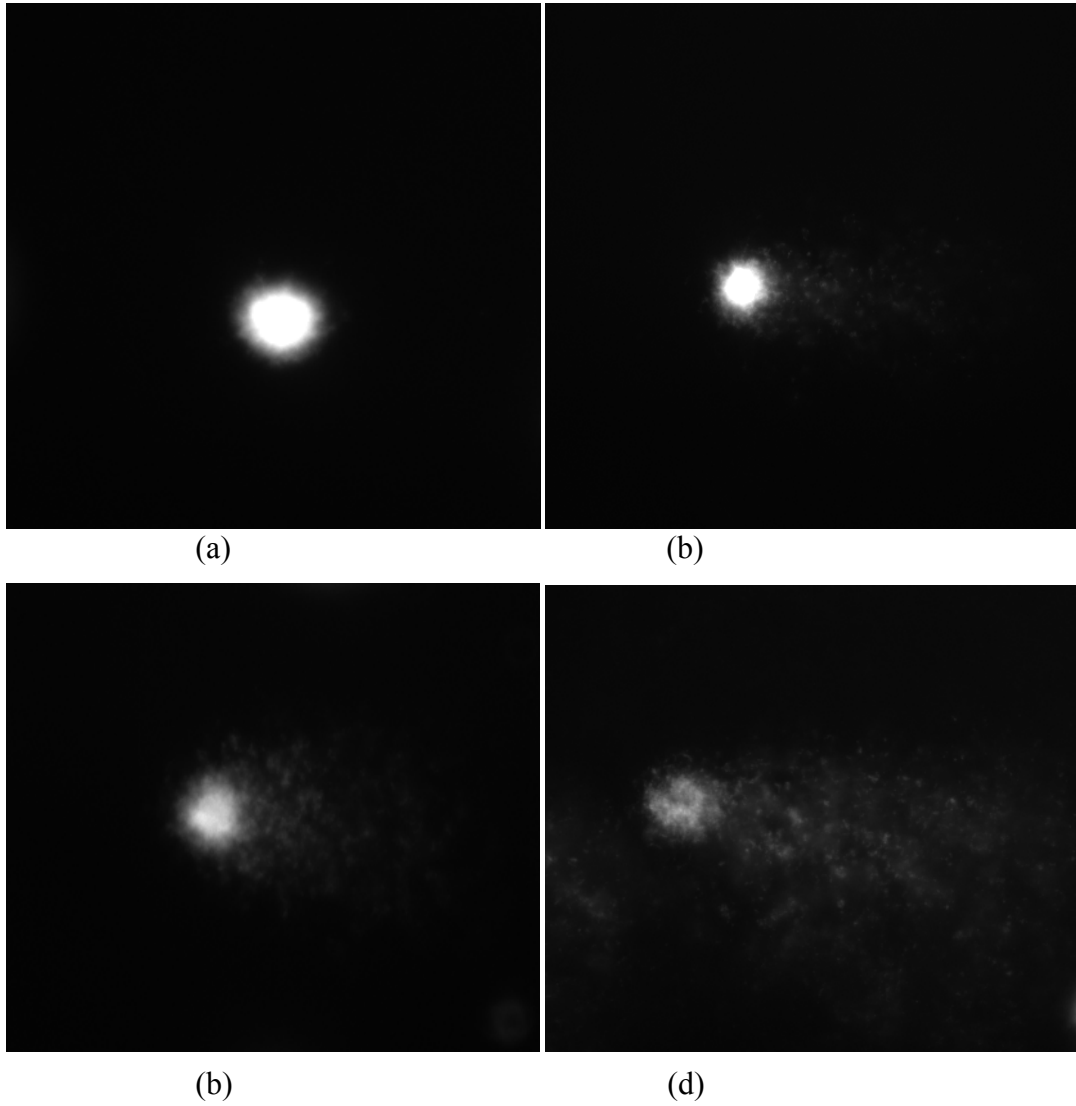
*Kontrole göre $p < 0,005$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.6. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.7. Acephate ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk uzunluğu



Resim 4.4. Acephate ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

4.2. Mephosfolan Uygulaması

Mephosfolan'ın neden olduğu kromozom anormallikleri, anormal hücre frekansları ve KA/hücre sayısı Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Mephosfolan insektisiti, insan lenfositlerinde en çok kromatid (%54,6) ve kromozom kırığı (%21,7) oluşmasına neden olmuştur. Bu anormallikler uygulanan bütün konsantrasyon ve sürelerde ortaya çıkmıştır. Daha düşük sayılarda olmakla beraber fragment (%12,7), kardeş kromatidlerde birleşme (%8,5), disentrik (%1,9) ve poliploidi (%1,4) tipinde anormalliklerine de neden olmuştur. Yapılan analizler anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormallikleri frekansının kontrole göre tüm doz ve uygulamalar sürelerinde istatistiksel olarak önemli oranda (0,125 için $p<0,01$; diğer dozlar için $p<0,001$) arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,80$; 48 saatlik uygulamada $r=0,88$) (Çizelge 4.5., Şekil 4.8. ve 4.9., Resim 4.5.).

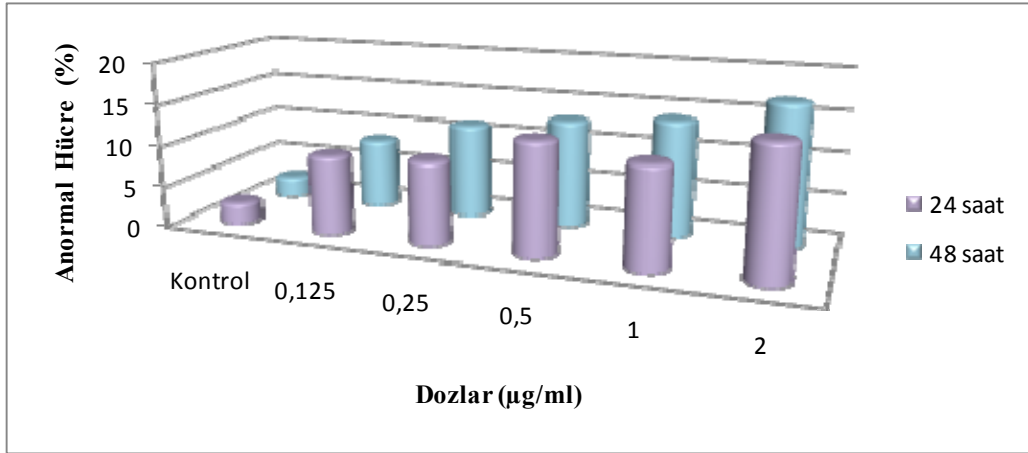
Çizelge 4.5 Mephosfolan uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)	ktk	kzk	f	Kkb	dis	kd	p			
Kontrol	24	-	5	-	-	-	-	-	-	-	2,50±1,104	0,025±0,110
MMC	24	0,20	32	11	-	4	5	6	-	-	23,50± 2,998	0,290±0,032
Mephosfolan	24	0,125	9	5	2	1	-	-	-	-	9,50± 2,073*	0,008±0,019*
	24	0,25	10	4	2	4	-	-	-	-	10,00± 2,121**	0,008±0,019**
	24	0,50	9	3	4	3	-	-	-	-	13,50±2,416**	0,115±0,022**
	24	1,00	8	6	2	2	-	-	-	-	12,00±2,978**	0,120±0,023**
	24	2,00	8	5	2	1	-	-	-	-	15,50±2,559**	0,140±0,025**
Kontrol	48	-	5	-	-	-	-	-	-	-	2,50±1,104	0,025±0,011
MMC	48	0,20	47	15	13	6	-	9	-	-	4,50 ±1,466	0,450±0,035
Mephosfolan	48	0,125	9	4	2	2	-	-	-	-	8,50±1,972*	0,085±0,0197*
	48	0,25	13	3	1	-	-	-	2	-	11,50±2,250**	0,115±0,022**
	48	0,50	15	7	4	2	2	-	-	-	13,00±2,378**	0,115±0,022**
	48	1,00	16	3	4	1	1	-	-	-	14,00±2,453**	0,135±0,024**
	48	2,00	21	6	4	2	1	-	1	-	17,00±2,656**	0,145±0,025**
Kromozomal anormallik yüzdesi			%54,6	%21,3	%12,5	%8,3	%1,9		%1,4			

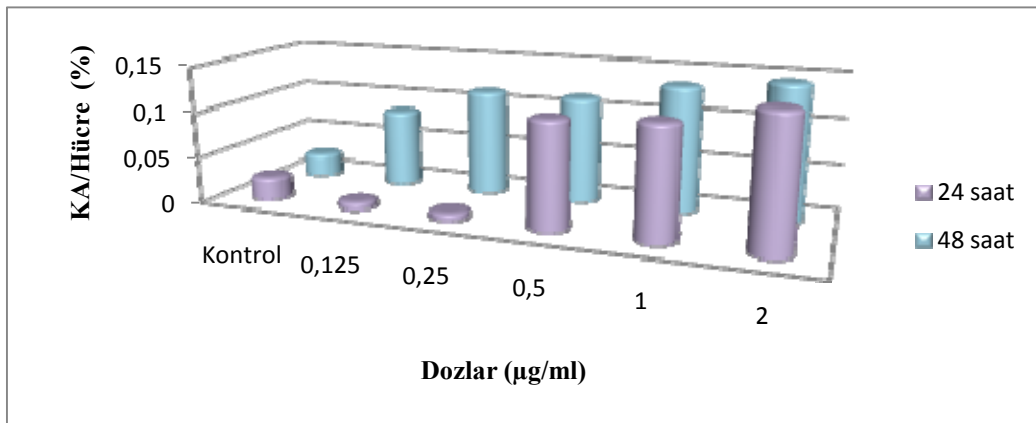
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik, kd: kromatid değişimi, p: poliploidi; f: fragment

*Kontrolle göre p< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

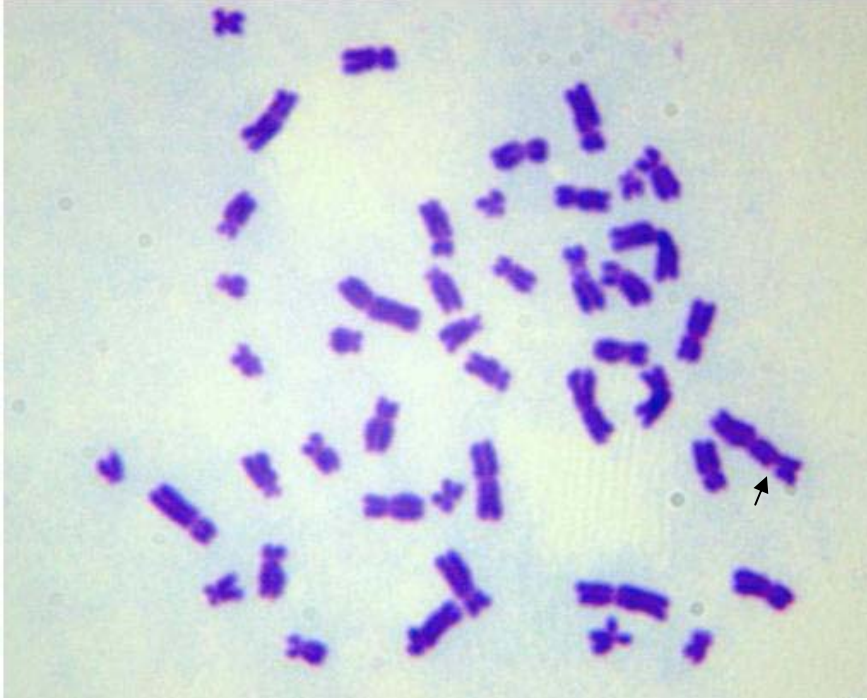
**Kontrolle göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



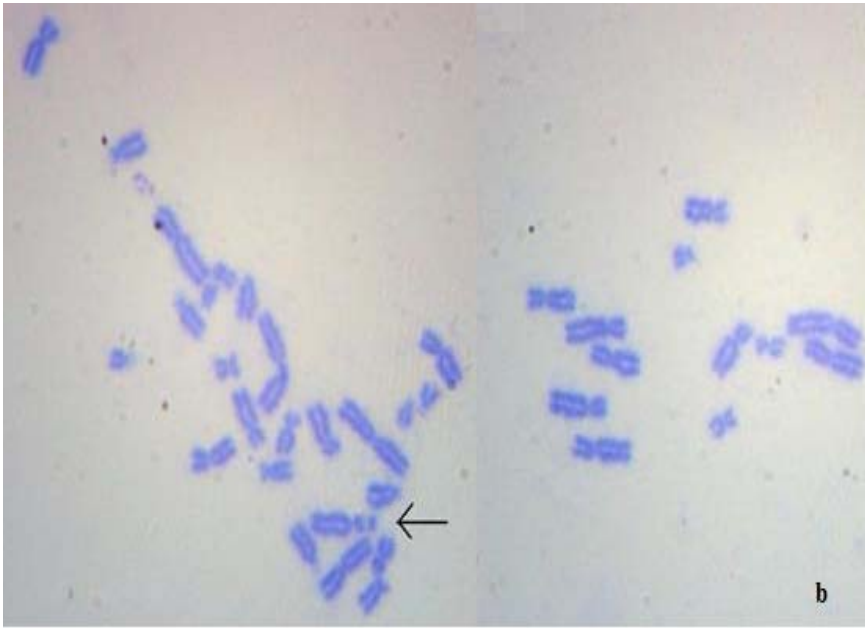
Şekil 4.8. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki anormal hücre frekansı



Şekil 4.9. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki hücre başına düşen kromozomal anormallik frekansı

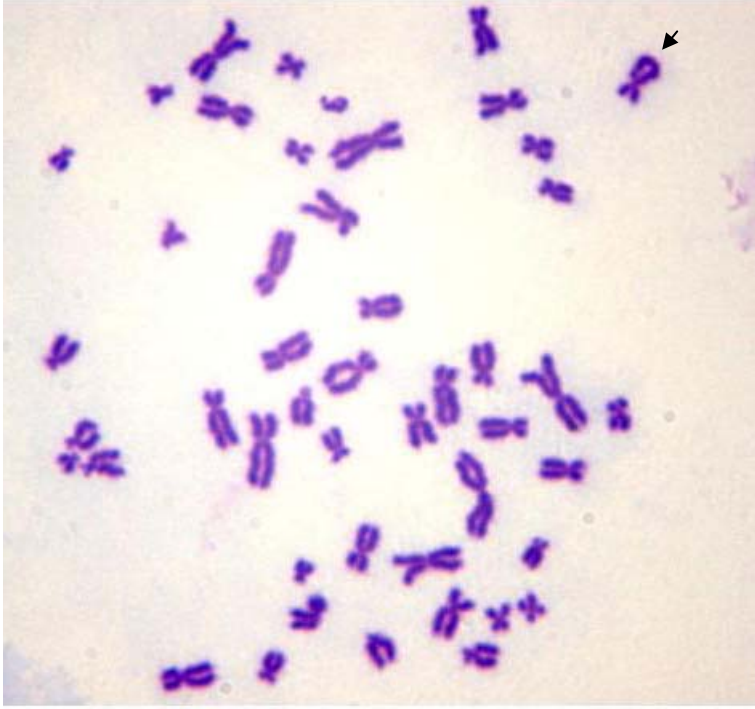


(a)

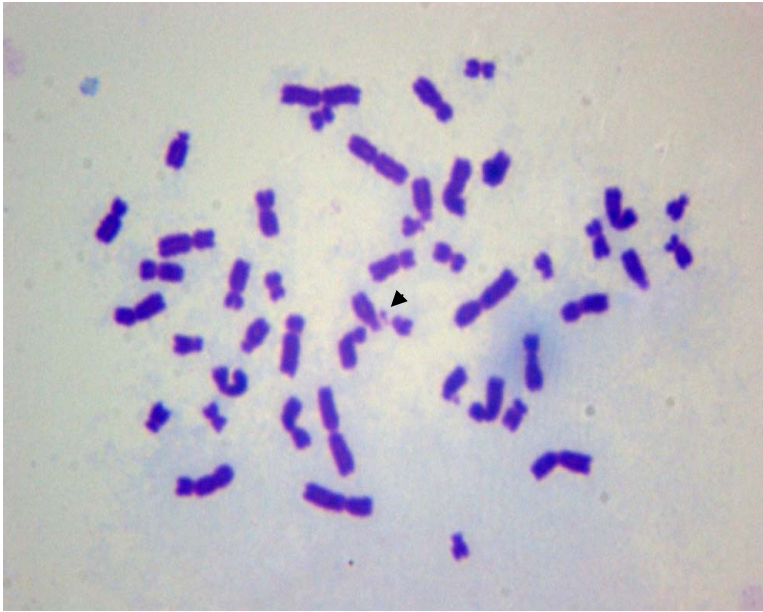


(b)

Resim 4.5. Mepfosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri
 a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı,
 c) kardeş kromatidlerde birleşme d) fragment e) poliploidi

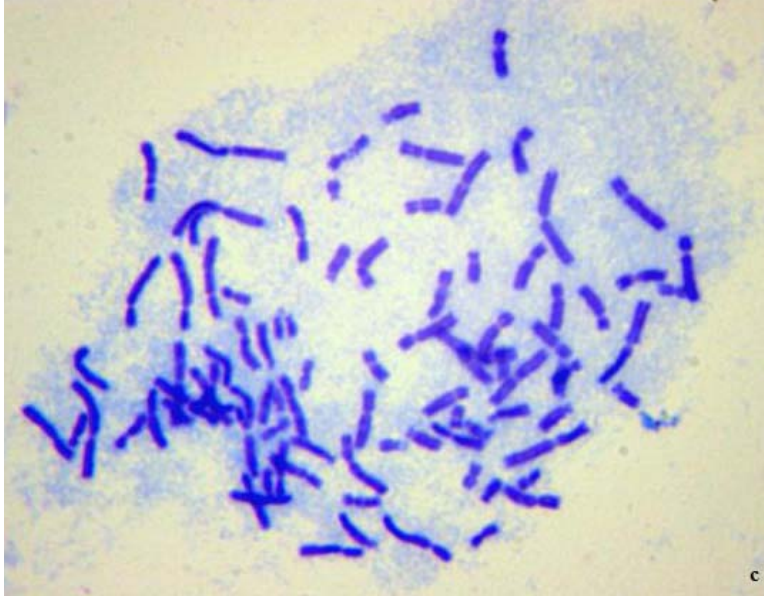


(c)



(d)

Resim 4.5. (Devam) Meposfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri
a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı,
c) kardeş kromatidlerde birleşme d) fragment e) poliploidi



(e)

Resim 4.5. (Devam) Mepfosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri

- a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı,
c) kardeş kromatidlerde birleşme d) fragment e) poliploidi

Mepfosfolan insektisitinin 24 ve 48 saat muamele süresi boyunca kültüre edilmiş insan lenfositlerindeki kromozomlarda kardeş kromotit değişimleri incelenmiştir. Mepfosfolan 24 ve 48 saatlik uygulamalarında tüm dozlarda KKD miktarını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır. Doza bağlı ancak kuvvetli olmayan bir artış gözlenmiştir (24 saat için $r=0,63$; 48 saat için $r=0,77$) (Çizelge 4.6., Şekil 4.10., Resim 4.6.). KKD test sonuçlarına göre Mepfosfolan'ın neden olduğu KKD miktarlarında minimum düzeydeki parça değişim miktarı 2 iken maksimum seviyedeki parça değişim miktarı 20'dir (Çizelge 4.6.).

Mepfosfolan'ın hücre bölünmesi üzerine etkisini incelemek amacıyla insan lenfositlerinde Mİ değerleri belirlenmiştir. Mitotik indeks 24 saatlik uygulamada 0,50; 1,00 ve 2,00 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda kontrole göre doza bağlı bir düşüş göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise 1,00 ve 2,00 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda istatistiksel olarak önemli düşüğe neden olmuştur (24 saat için $r=0,85$; 48 saat için $r=0,90$) (Çizelge 4.6., Şekil 4.11.). Replikasyon indeksindeki değişiklikler ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Çizelge 4.6.).

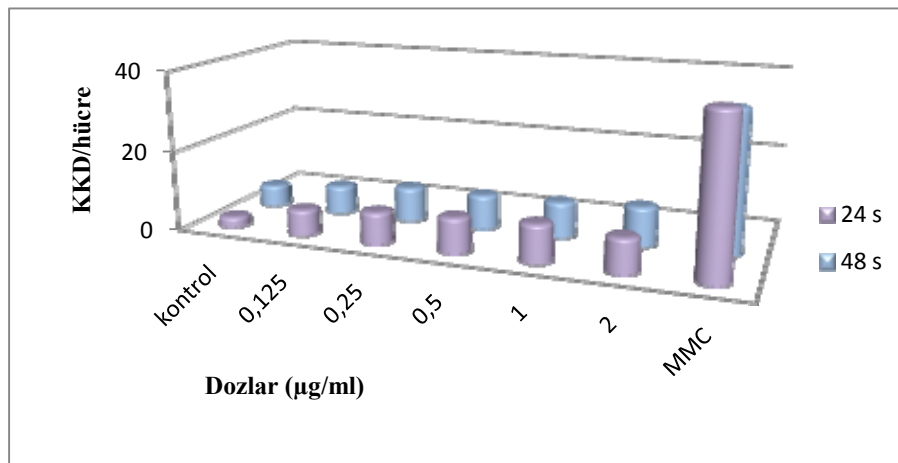
Çizelge 4.6. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları

Test maddesi	Uygulama		Min,- maks, KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	RI ± SH	MI ± SH
	Süresi (saat)	Dozlar (µg/ml)							
Kontrol	24	-	2-18	6,28±0,420	20	44	136	2,58±0,047	5,00±0,49
Pozitif Kontrol	24	0,20	17-52	35,82±1,347	97	60	43	1,88±0,090	4,20±0,45
Mephosfolan	24	0,125	2-20	6,56±0,446*	16	56	128	2,50±0,045	4,35±0,46
		0,250	5-18	7,98±0,382*	20	44	136	2,58±0,047	4,00±0,44
		0,50	4-16	8,82±0,406*	36	50	114	2,39±0,055	3,25±0,40**
		1,00	4-20	9,46±0,416*	32	48	120	2,44±0,053	3,00±0,38**
		2,00	5-14	8,54±0,420*	33	41	126	2,48±0,054	2,70±0,36***
Kontrol	48	-	2-12	5,46±0,290	20	42	138	2,19±0,060	4,25±0,45
Pozitif Kontrol	48	0,20	21-78	55,60±1,670	25	59	96	1,62±0,070	3,20±0,39
Mephosfolan	48	0,125	2-13	7,20±0,344*	23	31	146	2,62±0,048	3,75±0,42
		0,250	3-14	8,70±0,389*	23	39	138	2,59±0,049	3,50±0,41
		0,50	4-12	8,70±0,316*	29	31	140	2,55±0,052	3,10±0,39
		1,00	5-14	8,92±0,319*	30	43	127	2,27±0,055	2,75±0,37**
		2,00	6-16	9,84±0,338*	32	51	130	2,44±0,054	2,45±0,35**

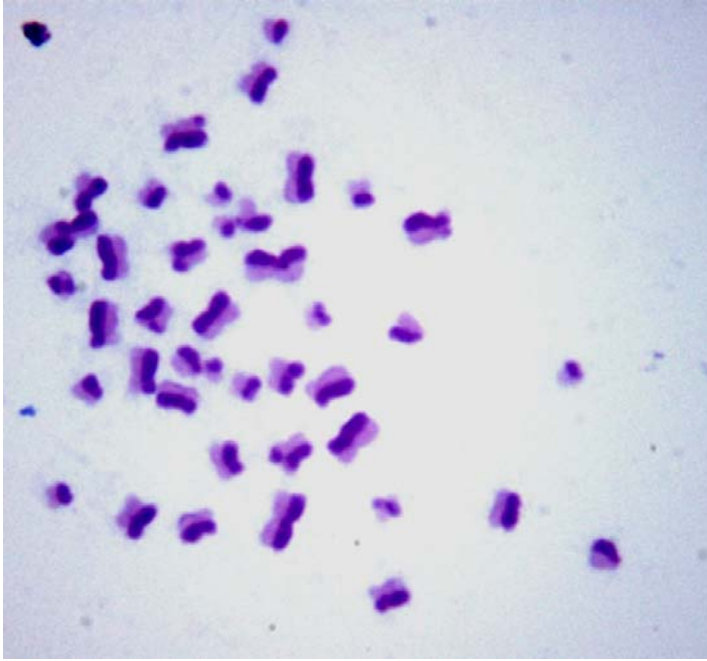
* Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

** Kontrole göre p< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

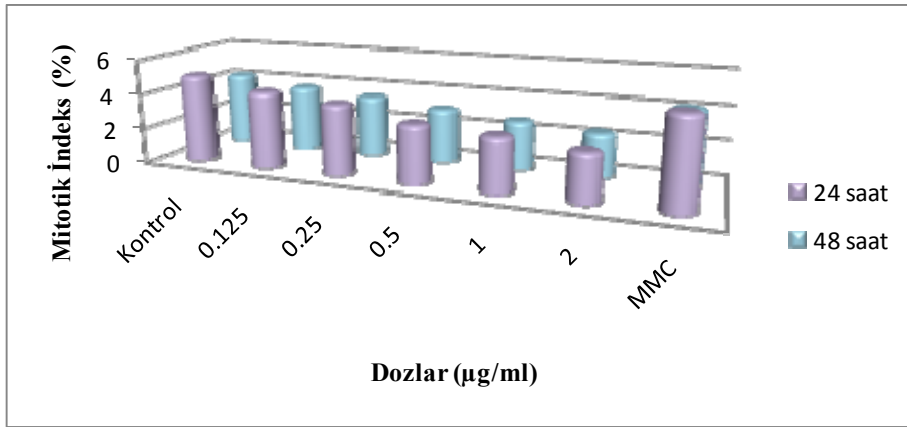
***Kontrole göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.10. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki KKD frekansı



Resim 4.6. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimi



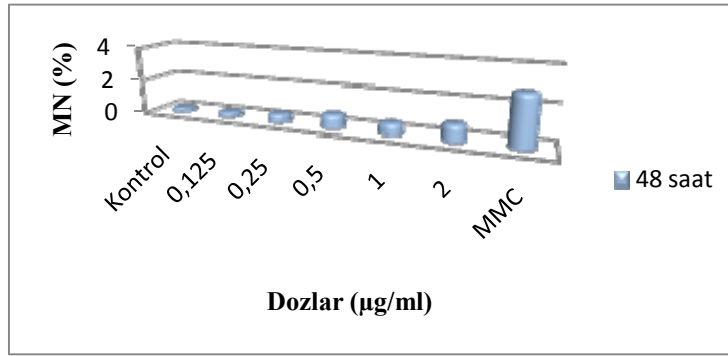
Şekil 4.11. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mitotik indeks frekansı

Mephosfolan insektisitinin uygulaması sonucunda mikronükleus frekansları 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarında kontrole göre anlamlı artış göstermiştir. Mikronükleus frekansındaki bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,85$) (Çizelge 4.7., Şekil 4.12., Resim 4.7.). Mephosfolan uygulanması sonucunda birli, ikili ve üçlü mikronükleuslu binükleat hücreler gözlenmiştir. Mephosfolan insektisitinin nükleer bölünme indeksine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

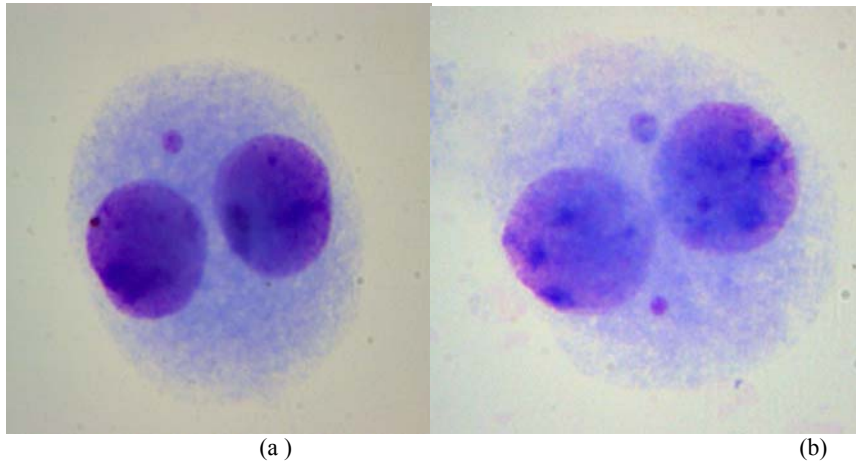
Çizelge 4.7. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfosit kültüründe mikronükleus frekansı

Test maddesi	Uygulama		Sayılan BN hücreler	BN hücreler içinde mikronükleusların frekansları				MN (%)	Nükleer bölünme indeksi (NBI)
	Süre (saat)	Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	-	2000	4	-	-	-	0,20 \pm 0,09	1,88 \pm 0,429
MMC	48	0,20	2000	38	5	3	-	2,85 \pm 0,37	1,85 \pm 0,426
Mephosfolan	48	0,125	2000	5	-	-	-	0,25 \pm 0,11	1,91 \pm 0,433
n		0,250	2000	6	2	-	-	0,45 \pm 0,15	1,92 \pm 0,434
		0,50	2000	11	2	-	-	0,75 \pm 0,19*	1,94 \pm 0,436
		1,00	2000	12	-	-	-	0,60 \pm 0,17*	1,84 \pm 0,425
		2,00	2000	16	1	-	-	0,90 \pm 0,21*	1,90 \pm 0,432

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



Şekil 4.12. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerindeki mikronükleus frekansı



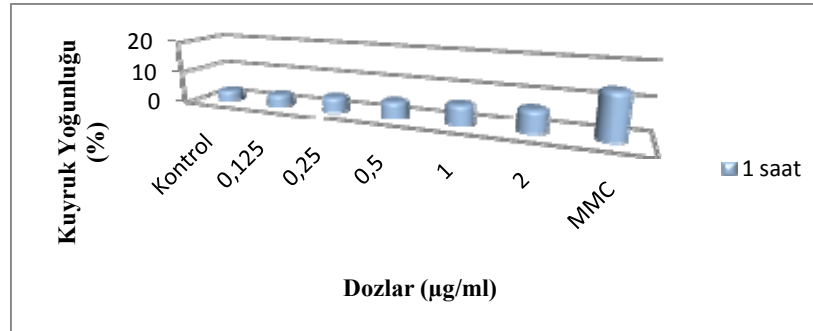
Resim 4.7. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleuslu hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus

Mephosfolan insektisiti ile maruz bırakılan izole edilmiş lenfosit DNA'larındaki hasarın ölçülmesinde comet test tekniğinden yararlanılmıştır. DNA hasarı sonucu oluşan kuyruk uzunluğunun artışı 0,125; 0,50 ve 1,00 µg/ml'lik dozlarda, kuyruk yoğunluğunun artışı ise 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarda anlamlı düzeydedir (Çizelge 4.8., Şekil 4.13. ve 4.14., Resim 4.8.).

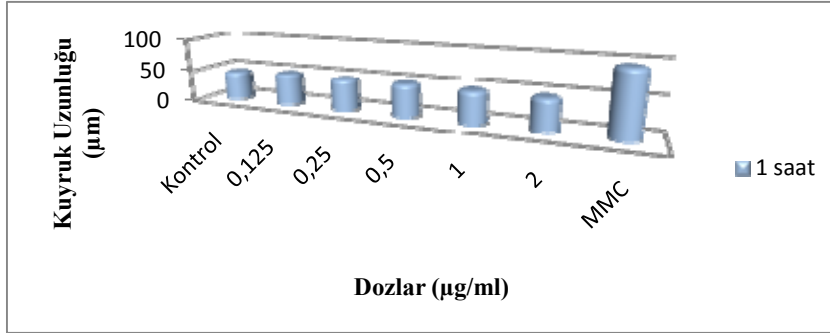
Çizelge 4.8. Mephosfolan ile 1 saat muamele sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk yoğunluğu (%)
Kontrol	0,00	45,31±0,58	3,10 ± 0,39
Mephosfolan	0,125	49,12±1,11*	3,51 ± 0,55
	0,25	47,74±1,21	4,50 ± 0,80
	0,50	48,73±1,27*	5,09 ± 0,71*
	1,00	47,64±0,84*	6,16 ± 0,87*
	2,00	47,28±1,03	6,82 ± 0,87*
Pozitif Kontrol	0,30	95,82±3,96	13,59±2,36

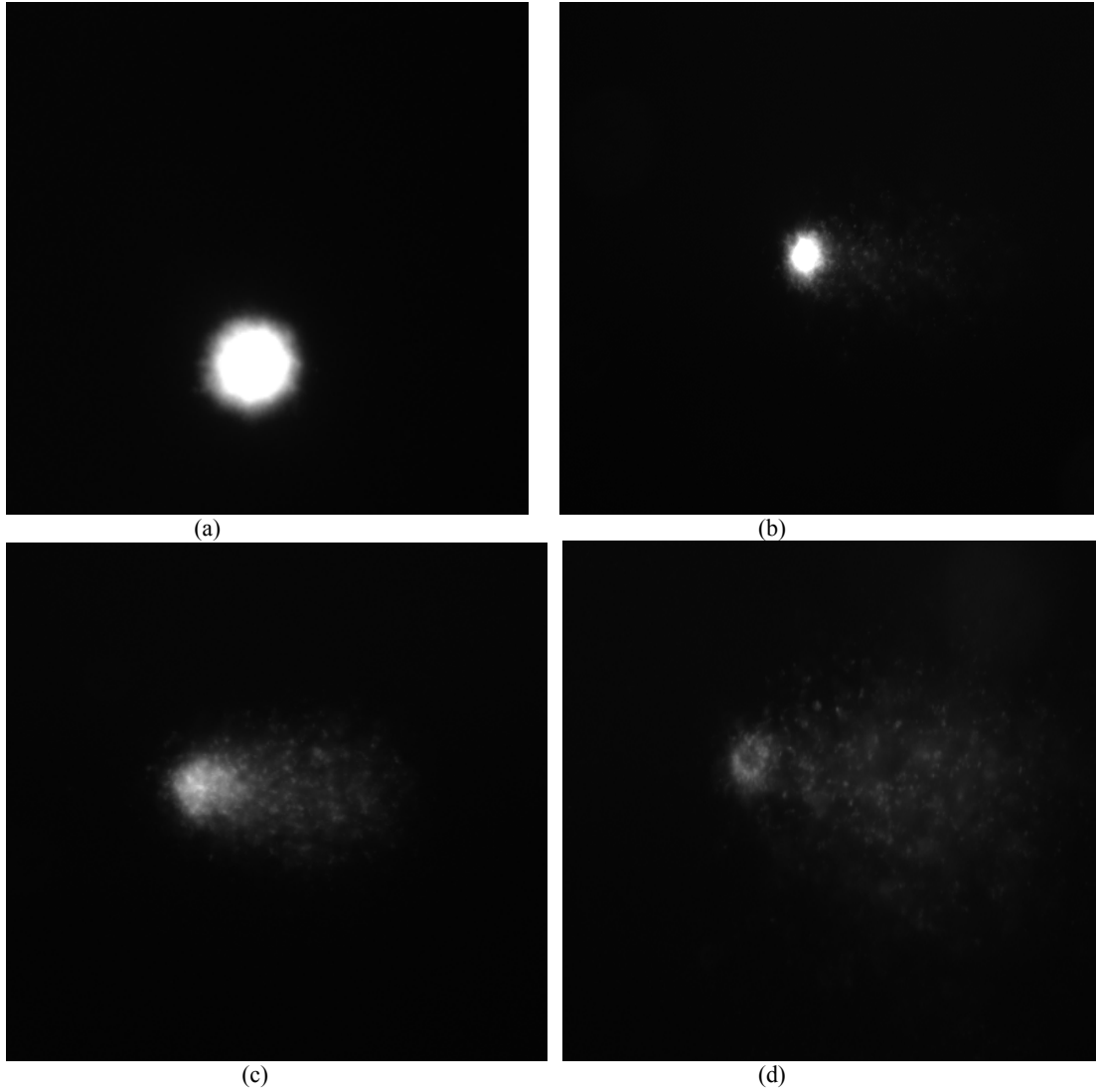
*Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.13. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan comet kuyruk yoğunluğu



Şekil 4.14. Mephosfolan ile muamele edilmiş insan lenfositlerinde oluşan kuyruk uzunluğu



Resim 4.8. Mephosfolan ile muamele edilen insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pestisitler, tarım alanında yaygın ve yüksek miktarlarda kullanılan kimyasallardır. Zararlı kontrolünü sağlamak amacıyla çevreye istemli olarak uygulanmaları ile diğer kimyasallardan farklılık gösterirler. Pestisitlerin birçoğunun çok zehirli kimyasallar olduğu bilindiğinden gerek üretimleri gerekse kullanımları sırasında sağlık için son derece çok tehlikeli olabilecekleri göz önüne alınmalıdır. Gelişmekte olan ülkelerde, pestisitlerden kaynaklanan zehirlenmeler ve ölümler, enfeksiyon hastalıkları nedeniyle meydana gelen ölümlerden daha fazladır [Eddleston ve ark. 2002].

Pestisitlerin tarımda yüksek miktarlarda, geniş ölçüde ve uzun yıllar boyunca kullanımları birçok böcek populasyonunun bu kimyasallara karşı hassasiyetini kaybederek dirençli hale gelmesine neden olmuştur [Kovganko ve Kashkan, 2004]. Ayrıca pestisitlerin insanlarda lösemi (Brown ve ark. 1990; Blair ve Zahm, 1995), mesane kanseri (Viel ve Chalier, 1995), non-Hodgkin's lenfoma (Waddel ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2001; Chiu ve ark., 2004), pankreas kanseri (Ji ve ark., 2001) ve Parkinson (Jenner, 2001) gibi genetik hastalıklara yol açtığı belirtilmiştir [Brown ve ark. 1990; Blair ve Zahm, 1995; Viel ve Chalier, 1995; Waddel ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2001; Ji ve ark., 2001; Jenner, 2001; Chiu ve ark., 2004;].

Son yıllarda insanlarda mesleki ya da çevresel olarak pestisit maruziyetinin genotoksik etkileri olabileceğine dair veriler artmış, bundan dolayı pestisitlerin olası mutajenik ve karsinojenik özellikleri ile ilgili araştırmalar yaygınlaşmıştır. Yaşayan tüm organizmalarda değişen düzeylerde istenmeyen etkilere ve çevrede kalıcılıkları sonucu kirliliklere neden olabildiklerinden toksisitelerinin tam olarak aydınlatılması ve risk değerlendirilmelerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca her yıl pek çok yeni pestisit bileşiğinin sentez edilip kullanıma girmesi bu bileşiklerin insan sağlığı üzerinde olası toksik etkilerinin ortaya çıkarılması gerekliliğini ortaya koymaktadır [Ündeğer, 2001].

Kimyasalların olası genotoksik etkilerinin araştırılmasında; kültürdeki insan periferel kan lenfositlerinde uygulanan kromozomal anormallikler, kardeş kromatid değişimi analizleri ve mikronükleus testi en sık kullanılan testlerdir. Kromozomal aberasyonlar, insanların genotoksik ajanlara maruziyetinin en önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir [Obe ve ark., 2002]. Genotoksisite çalışmaları, kromozomal anormalliklerin kanser oluşumunun erken ve dikkat çekici bir habercisi olabileceğini göstermektedir [Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark. 1998]. Kardeş kromatid değişimi analizleri hızlı ve hassas bir test olması bakımından tercih edilmektedir. Kardeş kromatid değişim frekansında artış olması, kalıcı DNA hasarının göstergesi olarak düşünülmektedir [Palitti ve ark., 1982]. Mikronükleus testi de genotoksik ya da genotoksik olmayan (aneujenik-turbojenik) kimyasalları saptamada kullanılan metotlardandır. Mikronükleuslar hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kaybını göstermektedir. Bu nedenle *in vitro* mikronükleus testi, mutajenik etkilerin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir test olarak kabul görmektedir [Fenech, 2000].

Pestisitlerin genotoksik etkilerini belirleyebilmek için insan lenfosit kültürlerinin kullanıldığı çalışmalarda, etkisi araştırılacak kimyasalın uygulanma süresi belirlenirken, hücre siklusu dikkate alınarak bu süreler 24 veya 48 saat olarak seçilmiştir [Hrelia ve ark., 1996]. Genotoksisite araştırmalarında kullanılan insan lenfositlerinde hücre siklusu yaklaşık 24 saat olduğundan ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesi için inkubasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir [Çelik, 2003]. Acephate ve Mephosfolan insektisitleri için KA ve KKD testlerinin uygulama süresi 72 saat belirlenmiş olup böylece kimyasalların sırasıyla 24. ve 48. saatlerde verilmesi ile 1 ve 2 hücre siklusu boyunca kültürde kalması sağlanmıştır. MN çalışması için ise uygulama süresi 48 saat olarak uygulanmış olup kimyasalların 2 hücre siklusu boyunca kültürde kalması sağlanmıştır. Comet testi ile kültür ortamında incelenecek kimyasal değerlendirilirken uzun maruziyet periyotları tercih edilmemektedir. Çünkü birinci DNA hasarları tamir edilebilmekte ve hasar yeniden oluşmamaktadır. Bunun nedeni kimyasalın aktivasyonunu yitirmesidir [Sekihashi ve ark., 2003]. Bundan dolayı comet testinde uygulama süresi 1 saat olarak belirlenmiştir.

Kromozomlardaki kırılmanın ve yeniden düzenlenmenin en iyi gözlemlendiği aşama mitoz bölünmenin metafaz aşamasıdır. Kromozomal anormallik tekniğinde hücreler kolşisin eklenmesi sonucu metafaz aşamasında tutulur ve kromozomlar en iyi görüldükleri bu aşamada incelenir.

Bu çalışmada Acephate ve Mephosfolan'ın kültüre edilmiş insan lenfositlerine uygulanması sonucunda, tüm doz ve sürelerde KA frekansının kontrole göre anlamlı oranda artırdığı belirlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak da anlamlıdır. Ayrıca bu insektisitlerin en fazla neden olduğu anormallikler ise kromatid ve kromozom kırıklarıdır. Tüm bu sonuçlar Acephate ve Mephosfolan'in klastojenik olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda genotoksik ajanlara maruziyetin önemli bir neticesi olan kromozomal anormallikler, kromozomal DNA'ya hasar veren çeşitli ajanlar tarafından oluşturulabilmektedir [Antunes ve ark., 2005]. Kimyasalların birçoğu tarafından indüklenen yapısal aberasyonlar kromatid tipidir ve bunlar genellikle kimyasal muamelenin ardından, DNA sentezinden sonraki ilk metafazda belirlenir [Satoh ve ark., 2002]. Kromatid tipi kırık kromozomun iki kromatidinden birinde kırık olması durumudur. Aradaki boşluk kromatid kalınlığından daha geniş ve doğrultusu da genelde daha farklıdır. Kromozom kırığı ise bir kromozomun her iki kromatidinde de kırık olması durumudur. Kromozomlarda oluşan kırıklar eğer birbirlerine yakın olursa, kırık uçlar tekrar birleşerek yeniden düzenlenmiş kromozomlar oluşabilmektedir. Bu durum kromozomun onarılması şeklinde ya da disentrik kromozomlar, translokasyonlar ve ters dönmeler (inversiyon) şeklinde anormalliklere neden olmaktadır. Disentrik kromozomda uç kısmında kromozom kırığı şeklinde bir kırılma olmakta ve sentrik fragmentlerin kopuk uçlarının birbiriyle birleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Poliploidi ise sayısal bir anormallik tipi olup, bir hücrenin ikiden fazla kromozom takımını bulundurması olarak tanımlanmaktadır [Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995].

Kromozom anormalliklerinin kimyasalların alkilleyici özelliklerinden kaynaklandığını belirten araştırmacılar, alkilleyici ajanların DNA hasarına neden

olduğunu açıklamışlardır. Kimyasalların mutajenik aktivitesinin kimyasalların yapısındaki elektrofilik kısmın DNA'daki nükleofilik kısma bağlanabilme kapasitesine bağlı olduğu belirlenmiştir [Searle, 1984; Çelik, 2003]. DNA hasarı genel olarak hücre döngüsünün G2 fazında onarılır, bu nedenle kromozom anormalliklerinin oluşumunda bu aşama önemlidir. Kromozom anormalliklerin artması DNA onarımının yapılamadığını, yanlış yapıldığını ya da onarımın engellendiğini göstermektedir [Natarajan, 2002]. Kromozom kırıklarının DNA'nın fosfodiester omurgasındaki kırılmalardan olduğu belirlenmiştir [Çelik, 2003].

Behera ve Bhunya (1989), Acephate'in ticari formu olan Asataf'ın (%75 aktif madde) genotoksik etkilerini fare kemik iliği hücrelerinde *in vivo* kromozomal anormallik testi ile incelemişlerdir. İntraperitoneal yolla farelere 24 saatlik sürede ve 120 saat boyunca 5 kez 50 mg/kg'lık dozlar uygulanmıştır. Fare kemik iliğinde KA miktarında anlamlı bir artış olduğu belirtilmiştir. Tüm sonuçlarda doz etki ilişkisi gözlenmiştir ($r=0,95$). Meydana gelen anormallikler ise kromatid gapları ve kırıklar, asentrik fragmentler ve kromatid değişimleridir. Kromozomal anormalliklerden en fazla gözlenenin ise izokromatid gaplar ve kırıklar olduğu açıklanmıştır [Behera ve Bhunya, 1989].

Wang ve arkadaşları (2003), Acephate'in da bulunduğu 5 farklı organofosfatlı insektisiti Çin hamster hücre hatlarına uygulamışlardır. Uygulama sonucunda Acephate en yüksek dozda (5 mg/ml), Acephate'in metaboliti olan Methamidophos ise en yüksek üç dozda (0,2; 1 ve 5 mg/ml) KA frekansında artışa neden olmuştur. Bu çalışmada en sık rastlanılan anormalliklerin kromatid ve kromozom kırıkları olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre bu insektisit DNA alkilasyonu sonucu DNA hasarı oluşturarak memelilerde genotoksisiteye neden olabileceği belirtilmiştir [Wang ve ark., 2003].

Das ve arkadaşlarının (2008) yapmış oldukları çalışmada, Acephate'in kromozom anormalliği etkisinin incelenmesi amacıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 μ M dozları insan lenfosit kültürü 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda Acephate doza bağlı olarak KA frekansını artırmıştır. Yapılan bu çalışmada Acephate'in

meydana getirdiği anormallikler ise fragment, gap, satellit birleşmesi, kromozom ve kromatid kırıklarıdır. Bu alışmada Acephate'nin hedef hücrelerde DNA hasarına sebep olarak sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [Das ve ark., 2008].

Organofosfatlı bir insektisit olan Profenofos'un genotoksik etkisi kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KA testi ile incelenmiştir. Bu alışmada KA doza bağlı olarak artmıştır ve incelen hücrelerin %44'ünün kromozomal anormallik içerdiği belirlenmiştir. En fazla görülen anormallik çeşidi ise kromatid kırığıdır [Topaktaş ve Speit, 1989].

Profenofos ile yapılan bir başka çalışmada *in vitro* periferik kan lenfositlerinde kromozom anormalliği testi ile bu insektisitinin genotoksitesini incelenmiştir. Uygulama sonucunda Profenofos insektisitinin insan lenfositlerindeki kromozomal anormallik oranını uygulanan dozlara (0,25; 0,35 ve 0,45 μ M) bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Profenofos insektisitinin meydana getirdiği kromozomal anormallikler ise gap, fragment, kromatid ve kromozom kırıklarıdır [Das ve ark., 2006].

Lima ve arkadaşlarının (2005) yapmış oldukları çalışmaya göre Rotenone insektisitinin 1; 1,5 ve 2 μ g/ml dozları kültüre edilmiş insan lenfositlerinde hücre döngüsünün G1, G1/S, S ve G2 fazlarında uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda 1 ve 1,5 μ g/ml dozları G1 fazında poliploidi ve enderodublikasyona neden olmuştur. G1/S fazında KA frekansını doza bağlı (1; 1,5 ve 2 μ g/ml) olarak artmıştır. Rotenone insektisitinin S fazında uygulanması sonucunda ise kromozom anormallikler önemli derecede artış göstermiştir ($p < 0,01$). Ancak G2 fazında KA frekansı önemli bir artış göstermemiştir. En fazla meydana gelen anormallikler ise gap ve kromatid kırıklarıdır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre Rotenone hücre döngüsünün tüm safhalarında sitotoksik etkiye, G1/S ve S fazlarında yapılan tüm uygulamalardan elde edilen sonuçlara göre ise klastojenik etkiye neden olduğu belirtilmiştir. G1 fazındaki hücrelerde poliploidi ve enderodublikasyona neden olması Rotenone'in mitotik iğ iplikleri üzerinde etkiliği olduğunu göstermiştir [Lima ve ark., 2005].

Methidathion ve Triadimenol pestisitlerinin genotoksik etkilerini KA testi ile belirlemek amacıyla insan periferik lenfositleri 4 farklı dozdaki Methidathion (3,75; 7,50; 15 ve 30 µg/ml) ve Triadimenol (2,50; 5; 10 ve 20 µg/ml) ile 24 ve 48 saat süre muamele edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre anormal hücre frekansını, triadimenol bütün uygulama dozları ve sürelerinde kuvvetli derecede doza bağlı olarak artırmış iken Methidathion da 24 saatte daha kuvvetli olmakla birlikte anormal hücre frekansını her iki uygulama süresinde doza bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir. Her iki pestisit uygulamasında en sık gözlenen kromozomal aberasyonlar kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozom ve kromatid kırığıdır. Bu sonuçlara göre bu iki pestisit klastojenik etkiye neden olduğu belirtilmiştir [Demir, 2005].

Bu çalışmada kullanılan diğer bir test olan kardeş kromatid değişimi (KKD) testi, kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testlerinden biri olup, en hassas ve en fazla kabul edilen yöntemlerden birisidir [Bolognesi, 2003; Bağcı ve ark., 2005]. KKD testinde her bir doz ve muamele süresi için ikinci mitoz geçiren iyi dağılmış 50 metafaz hücresi incelenerek kardeş kromatidlerdeki parça değişimleri sayılmıştır. Acephate 24 saatlik uygulama sonuçlarında en yüksek üç dozda (50, 100 ve 200 µg/ml), 48 saatlik uygulama sonucunda ise en düşük doz hariç (12,5 µg/ml) diğer dozlarda kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda ve doza bağlı bir artış göstermiştir. Mephosfolan ise her iki uygulama süresinde ve tüm dozlarda KKD miktarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır. KKD test sonuçlarına göre Acephate ve Mephosfolan insan lenfositlerinde DNA hasarına neden olarak KKD/hücre frekansını artırdığından dolayı genotoksiktir.

Kardeş kromatid değişiminin yüksek frekansa sahip hücrelerin belirlenmesi mutajenik ve karsinojenik bileşiklerin saptanması için hassas bir göstergedir [Bozkurt ve ark, 2004]. KKD sıklığı sadece test edilen genotoksik ajandan değil, aynı zamanda DNA replikasyonunu etkileyen enzimler gibi endojen ajanlar, oksidatif stres ve bireyler arasındaki genetik çeşitlilik gibi faktörlerden de kaynaklanmaktadır. KKD, yeni eşleşmiş kromatid ve bunun kardeş kromatidi arasında karşılıklı değişimlerle sonuçlanan S fazıyla ilişkili bir tamir işlemidir [Stanimirovic ve ark., 2005]. KKD oluşum mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen DNA'daki

hasarın ve yanlış onarımının KKD' ye neden olduğu düşünülmektedir [Bozkurt ve ark, 2004]. KKD oluşumunda DNA'nın çift ipliği kırılır, KKD oluşumu da özdeş DNA molekülleri arasındaki değişim şeklinde gerçekleşmektedir. DNA çift zincir kırıklarında tamir homolog rekombinasyon ve homolog olmayan rekombinasyon olmak üzere iki yolla yapılmaktadır. Homolog olmayan rekombinasyon; yüksek düzeyde sekans (DNA dizisi) homolojisi gerektirmeden kırık olan komşu DNA uçlarını tamir ederken (birbiriyle birleştirirken), homolog rekombinasyon mekanizması, tamir işlemi gerçekleştirebilmek için tam bir homolog diziyeye ihtiyaç göstermektedir [Bozkurt ve ark., 2004].

Gavaj yoluyla verilen Acephate'ın fare kemik iliği hücrelerindeki kromozomlarında KKD frekansı üzerine etkisi incelenmiştir. Bu insektisit en yüksek doz olan 96 mg/kg'da önemli düzeyde KKD artışına neden olmuştur. Bu çalışmada elde edilen verilere göre Acephate'ın mutajenik olduğu belirtilmiştir [Carver ve ark., 1985].

Methoxyphosphinyl karma bir pestisit olup içeriğinde Acephate ve diğer organofosfatlı insektisitler olan Dichlorvos, Monocrotophos, Methamidophos ve Trichlorfon'u içermektedir. Bu karma pestisitte bulunan her bir insektisit *in vitro* olarak CHO hücrelerine KKD testi uygulanmıştır. Bu uygulama sonucunda elde edilen verilere göre KKD oluşumunu en fazla artıran insektisitler sırasıyla; Acephate, Trichlorfon, Monocrotophos, Methamidophos ve Dichlorvos'dur [Wang ve ark. 2003].

Paraoxonase ve Methyl paration insektisiti (Wofatox) sıklıkla kullanılan organofosfatlı insektisitlerdir. Bu insektisitler kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KKD testi ile incelenmiştir. Bu uygulama sonucunda Paraoxonase önemli bir etki göstermez iken Methyl paration insektisiti doza bağlı bir artışa neden olmuştur [Singh ve ark., 1984].

Dimethoate ve Omethoate, iki organofosfatlı insektisit olup insan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda KKD frekansını doza bağlı olarak yükseltmiştir ($p<0,01$) [Dolara ve ark., 1992].

Demir (2005)'in insan lenfosit kültüründe Methidathion ve Triadimenol insektisitleri ile yapmış olduğu araştırmada KKD testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Methidathion hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi sayısını (KKD/hücre) doza bağlı olarak artırmıştır. Buna göre bu pestisitlerin mutajenik etkiye neden olduğu belirtilmiştir [Demir, 2005].

Organofosfatlı bir insektisit olan Malathion'un insan lenfositlerinde uygulanan dozlarında (0,02; 0,2; 2 ve 20 µg/ml) KKD frekansını doza bağlı olarak artırdığı gözlenmiştir. Malation insektisinin KKD değerlerini artırdığı için klastojen olduğu ve en yüksek dozlarının insanlar için genotoksik olabileceği açıklanmıştır [Balaji ve Sasikala, 1993].

Profenofos insektisinin insan lenfosit kültüründe KKD frekansını artırdığı gözlenmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur [Topaktaş ve Speit, 1989].

Feng ve arkadaşlarının (2005) yapmış oldukları çalışmada ise Imidacloprid ve RH-5846 insektisitleri kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KKD frekansında en düşük dozlarda (imidacloprid için 0,005 mg/L, RH-5846 için 5 mg/L) negatif kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış oluşturmazken diğer tüm dozlarda (imidacloprid için 0,01 ve 0,5 mg/L, RH5846 için 25 ve 100 mg/L) önemli düzeyde bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu artışın her iki pestisit için de doza bağlı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak her iki pestisit de kromozomlarda DNA hasarına yol açarak genotoksisiteye neden olduğu belirtilmiştir [Feng ve ark., 2005].

Fare dalak hücre kültüründe Gardona ve Dursban insektisitlerinin toksisitesi KKD yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Gardona (0,25; 0,5; 1 ve 2 µg/ml) ve Dursban (0,5; 1; 2 ve 4 µg/ml) insektisitlerinin en yüksek uygulama dozları KKD/hücre frekansını artırmıştır [Soheir ve ark., 1992].

Ayrıca organofosfatlı bileşiklere maruz kalmanın, KKD gibi sitogenetik hasarla sonuçlandığı Padmavathi ve arkadaşları (2000) ile Yadav ve Kaushik (2002) tarafından da gösterilmiştir [Padmavathi ve ark., 2000; Yadav ve Kaushik, 2002].

Topaktaş ve Speit (1990) KKD ve kromozomal anormalliklerin birbirinden farklı mekanizmalarla oluşan farklı DNA hasarları sonucunda meydana geldiğini bildirmiştir [Topaktaş ve Speit, 1990]. Organofosfatlı insektisitler ile ilgili genel olarak ifade edilen mekanizma ise, (“thion” adı verilen) P=S bağları içeren bu insektisitler sitokrom P450 sisteminde rol oynayan mikrozomal karma-fonksiyon oksidaz (MFO= microsomal mixed-function oxidase) enzimi tarafından (“oxon” adı verilen) P=O bağlarına dönüştürülür [Perry ve ark., 1998]. Bu oksonlar son derece toksik bileşiklerdir ve bu bileşikler organofosfatlı insektisitlerin sitotoksik etkisinin en etkili sebebidirler. Örneğin, Parathion ve Malathion pestisitlerinin metabolitleri olan paraokson ve malaokson daha toksik etkiye sahiptirler [Vijayaraghavan ve Nagarajan, 1994].

Organofosfatlı bileşikler alkilasyon özelliği de göstermektedirler ve metil esterlerinin etil esterlerinden daha fazla alkali potansiyeli bulunmaktadır [Wild, 1975; Garrett ve ark., 1990]. Kromozomlarda meydana gelen hasarın kimyasal alkilleyici ajanlardan kaynaklandığı ve bu ajanların DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir [Ferguson ve Denny, 1995]. Birçok genotoksik karsinojenler kritik makromoleküllere elektrofilik bağlanabilme ya da elektrofilik araçlarla bağlanabilme özelliği olduğu belirtilmiştir [Searle, 1984]. Bu kimyasalların ana moleküllerinde ya da oluşan metabolitlerinde oluşabilecek elektrofilik bölgeler DNA’da nükleofilik bölgelere bağlanabilir. Organofosfatlı bileşiklerin DNA’ya bağlanabildiği daha önce yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [Wild, 1975; Wauchope ve ark., 1992]. DNA’da oluşan bu bağlantıların da mutasyona neden olduğu belirtilmiştir [Rehana ve ark., 1996; Valkova ve ark., 1993].

Acephate ve Mephosfolan kültüre edilmiş insan lenfositlerinde replikasyon indeksi (RI) üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Bu durum çalışmada kullanılan insektisitlerin, hücre döngüsünün sentez safhasından sonra etki gösterdiklerini

düşündürmektedir. Birçok genotoksite çalışmasında replikasyon indeksinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir [Çelik, 2003; Demir, 2005; Aksoy ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Yılmaz ve ark., 2008; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008].

Bu çalışmada Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin hücre bölünmesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla mitotik indeks değerleri belirlenmiştir. Buna göre mitotik indekste Acephate 24 saatlik uygulamada 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise 12,5 µg/ml doz hariç tüm dozlarda kontrole göre doza bağlı düşüşe neden olmuştur. Mephosfolan ise 24 saatlik uygulamada en yüksek üç dozda (0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml), 48 saatlik uygulamada ise 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden olmuştur.

Mitotik indekste bu düşüş Acephate ve Mephosfolan'ın hücre bölünmesi üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Bu iki insektisit hücre bölünmesini engelleyici yani sitotoksik etkiye sahiptirler. Mitotik indeksteki azalma, hücrelerin mitoz girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesine ya da ATP seviyesinde azalma ve enerji üretim merkezindeki bozukluğa bağlanmaktadır [Epel, 1963; Jain ve Andsorbhoy, 1988]. Mitotik indeksteki düşüşün diğer nedenleri arasında DNA sentezinin engellenmesi, DNA sentezi için gerekli ve iğ oluşumundan sorumlu olan enzimlerin baskılanması [Hidalgo ve ark.,1989] ve G2 periyodunun uzaması da gösterilmektedir [Van't Hof, 1968].

Mitotik indeksin doza ve süreye bağlı olarak azaldığı pestisitlerle ilgili başka çalışmalarda mevcuttur. Organofosfatlı bir insektisit olan Methidathion 24 ve 48 saatlik uygulamaların her ikisinde de, doz arttıkça, mitotik indekste istatistiksel açıdan önemli bir azalma meydana getirmiştir. MI'deki bu doza bağlı düşüş sonucu Methidathion'un hücre bölünmesini engelleyici yani sitotoksik etkili olduğu belirtilmiştir [Demir, 2005].

Rotenone insektisiti ile yapılan çalışmada hücre döngüsünün G1, G1/S, S, G2 fazlarından G1 fazında uygulanan 0,1 µg/mL uygulama dozu hariç diğer tüm uygulama fazları ve dozlarında MI istatistiksel olarak önemli düzeyde düşüşe neden

olduğu gözlenmiştir. Bu düşüş Rotenone insektisitinin sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir [Lima ve ark., 2005].

Ayrıca Malathion (Balaji ve Sasikala,1993) insektisitinin mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir [Balaji ve Sasikala,1993].

Bu araştırmada kullanılan bir başka genotoksisite test yöntemi ise mikronükleus testidir. Mikronükleus hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir. Acephate insektisitinin uygulamasıyla kültüre alınmış insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları kontrole göre tüm uygulamalarda doza bağlı olarak önemli oranda artış gösterirken, Mephosfolan insektisitinin uygulaması sonucunda ise 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarında kontrole göre anlamlı ve doza bağlı bir artış gözlenmiştir. Buna göre Acephate ve Mephosfolan insan lenfositlerinde genotoksik etkiye sahiptir. Ancak bu insektisit nükleer bölünme indeksinde kontrole göre anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur.

Mikronükleuslar spontan olarak oluşabileceği gibi genotoksik ajanlara maruz kalınma sonucu da oluşabilmektedir. Mikronükleuslar, asentrik kromatid veya kromozom kırıklarından ya da anafazda kutuplara çekilemeyen kalgın kromozomlardan oluşur [Surreales ve ark., 1995]. Anöjenik kimyasalların birincil mekanizması, sentromerik DNA'ya etki ederek, kromozomların mitotik ipliklerin tutunduğu yerde hasar meydana getirmesidir [Parry ve ark., 2002]. Diğer bir mekanizması ise Op18/stathmin aktivitesinin inhibisyonudur. Bu protein hücre döngüsü sürecinde mikrotübüllerin düzenlenmesinde rol oynayan ana sistosolik fosfoproteinidir. Stathmin fosforilasyonla inaktivasyonu sonucu, tübülün polimerizasyonun ilerlemesine ve mitotik ipliklerin oluşumunun başlamasına neden olur [Larsson ve ark., 1997]. Mitozun ilerleyen safhalarında stathmin defosforilasyonu ile mitotik ipliklerin depolimerizasyonu gerçekleşir, böylece hücrenin yeni bir döngüye geçişini sağlar [Le Hegarat ve ark., 2003]. Eğer uygulanan kimyasal Op18/stathmin aktivitesine inhibe ederse mikrotübüllerde yapısal bir sabitleşme ortaya çıkar. Mitotik iğlerin organizasyonunda anormallikler oluşabilir ve mitozun tamamlaması zorlaşır [Song ve ark., 1990; Giri ve ark., 2002b]. Ayrıca

multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır [Topaktaş ve Rencüzoğulları,1995].

Behera ve Bhunya (1989) yapmış oldukları çalışmada fare kemik iliği hücrelerinde MN frekansını belirlemek amacıyla Acephate insektisitinin üç farklı dozunu (2x150, 2x200, 2x250 mg/kg) farelere intraperitoneal olarak verilmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre polikromatik eritrositlerde MN oluşumu sadece en yüksek dozda (2x250mg/kg) artış göstermiştir. Acephate'ın *in vivo* olarak genotoksik etkiye neden olduğu sonucuna varılmıştır [Behera ve Bhunya, 1989].

Karabay ve Oğuz (2005) tarafından, Imidacloprid ve Acephate'ın metaboliti olan Methamidophos'un tek başlarına ve kombinasyon halinde meydana getirdikleri sitogenetik ve genotoksik etkileri belirlemek için sıçan kemik iliği hücrelerinde KA ve MN testini kullanmışlardır. Wistar albino sıçanlarına 90 gün süreyle, günlük diyetleri içinde 50 ve 100 mg/kg dozlarda Imidacloprid, 2,5 ve 5 mg/kg dozlarda Methamidophos veya 2,5 ve 5 mg/kg dozlarda Imidacloprid+Methamidophos karışımı ağız yoluyla verilmiştir. İsektisitlerin uygulandığı tüm doz ve gruplarda kromozom aberasyonları kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede ve doza bağlı olarak artmıştır. Buna göre bu iki insektisit genotoksik oldukları belirtilmiştir [Karabay ve Oğuz, 2005].

Methidathion insektisitinin 48 saatlik uygulaması sonucunda bütün uygulama sürelerinde, mikronükleuslu binükleatların sayısında artışa neden olmuştur. Bu artış, 3,75 µg/ml'lik dozda negatif kontrole kıyasla istatistiksel açıdan önemli olmazken, diğer bütün dozlarda anlam teşkil etmiştir. Triadimenol ise hücre başına düşen MN sayıları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, bütün dozların önemli düzeyde MN oluşturduğu gözlenmektedir. MN sayısı doz artışına bağlı olarak artmıştır. Methidathion ve Triadimenol insektisitlerinin kültüre edilmiş insan lenfositlerinde klastojenik ve anojenik etkiye neden olduğu belirtilmiştir [Demir, 2005].

Titenko-Holland ve arkadaşları (1997) Malathion ile muamele ettikleri insan lenfosit kültüründe mikronükleus oluşumlarını incelemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen

sonuçlara göre organofosfatlı bir insektisit olan Malathion'un MN frekansını artırdığı ve en yüksek dozlarda da sitotoksik bir etki gösterdiği tespit edilmiştir [Titenko-Holland ve ark., 1997].

Kültüre edilmiş Çin Hamster akciğer hücrelerine uygulanan 22 organofosfatlı insektisit (Azinphos Ethyl, Chlorpyrifos, Ethion, Parathion, Phosaione, And Quinaphos, Azinophos Methyl, Chlorpyrifos Methyl, Dichlorvos, Dimethoate, Fenitrothion, Malathion, Parathion Methyl, Trimethyl phosphate, EII Ve MIA) MN frekansını kontrole göre artırmıştır [Ni ve ark., 1993].

İnsektisitlerle yapılan diğer çalışmalarda ise Novacron (Peitl ve ark.,1996), Furadan ve Carbofuran (Soloneski ve ark., 2008) Çin hamster ovaryum hücrelerinde MN frekansında artışa neden olmuşlardır.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir test metodu olan comet testi tek hücre alkali jel elektroforezi olarak da bilimektedir. Günümüzde *in vitro* genotoksisite çalışmalarında basit ve çok hızlı sonuç elde edilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Lenfosit hücresindeki DNA bağlarının kırılması sonucunda, elektroforez sonrasında hücreler kuyruklu yıldız (comet) görünümünde olduğu için yöntem Comet ismiyle de anılmaktadır. Araştırmacılar kuyruk oluşturmanın altında yatan nedenin alkali şartlarda iplikçiklerin gevşemesi olduğunu bulmuşlar (Klaude ve ark., 1996; Collins ve ark., 1997) ve yaptıkları çalışmalarda nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda bulunduğunu göstermişlerdir. Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denaturasyonu daha kolaydır. Bu DNA'da tek bağ hasarına neden olur [Klaude ve ark., 1996; Collins ve ark., 1997]. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur. Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin insan periferik lenfosit DNA'larında oluşturdukları hasar, comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu verileri kullanılarak belirlenmiştir.

Acephate insektisiti comet testinde comet kuyruk yoğunluğunu ve kuyruk uzunluğunu kontrole göre tüm dozlarda artırmıştır. Bu artış kuyruk yoğunluğunda yalnızca en yüksek doz olan 200 µg/ml'lik dozda anlamlı bulunurken, kuyruk uzunluğunda 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda anlamlı bulunmuştur. Mephosfolan'ın neden olduğu DNA hasarı sonucunda oluşan kuyruk uzunluğunun artışı 0,125; 0,50 ve 1,00 µg/ml'lik dozlarda, kuyruk yoğunluğunun artışı ise 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarında anlamlı düzeydedir. Bu sonuçlara göre Acephate ve Mephosfolan insektisitleri periferal insan lenfosit kültüründe genotoksik etkiye sahiptir.

Das ve arkadaşları (2008) yapmış oldukları çalışmada insan lenfosit kültüründe DNA hasarı belirlenmesi amacıyla comet testini uygulamışlardır. Acephate'in çeşitli dozları (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 µM) ile insan lenfositleri 2 saat boyunca muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu insektisit 1–7 µM dozlarında comet kuyruk uzunluğunda artışa neden olduğunu, 8, 9 ve 10 µM dozlarında ise lenfositlerde nekroza neden olduğunu göstermiştir [Das ve ark., 2008].

Acephate ile yapılan bir başka çalışmada ise insan periferal lenfosit kültüründe comet test yöntemi ile apoptoz ve nekroz etkisi incelenmiştir. Kültüre edilen hücreler 24 saat boyunca Acephate'in 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ve 1,0 µM'lık dozları ile muamele edilmiştir. Sonuçlar Acephate'in tüm uygulama dozlarının apoptozis ve nekroz oluşumunu doza bağlı olarak artırdığını göstermiştir. [Das ve ark., 2006]. Genel olarak düşük konsantrasyonlardaki kimyasallar apoptotik hücre ölümüne neden olur iken, yüksek konsantrasyonlardaki kimyasallar ise nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır [Olive ve ark., 1993; Fairbairn ve ark., 1996; Tice ve ark., 2000]. Kimyasalların etkisi ile DNA'da hasar oluşmakta ve bu hasar ise apoptotik hücre ölümü ile elimine edilmektedir. Bu yüzden apoptozis hücrelerde ölüm olarak adlandırılrsa bile DNA onarımına paralellik gösteren bir kontrol yöntemi olduğu düşünülmektedir [Koester ve Bolten, 1999].

Monotocrotophos, Profenofos ve Chlorpyrifos organofosfatlı insektisitlerin *in vitro* ortamda periferal insan lenfositlerinde comet testi yöntemi ile DNA üzerine etkileri

araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre bu insektistler doza bağlı olarak DNA'da apoptozis ve nekroz oluşumunu artırmıştır [Das ve ark., 2006].

Diğer bir çalışmada Acephate'ın Swiss albino erkek farelerinden elde edilen periferik kan lenfositlerde comet testi *in vivo* olarak gerçekleştirilmiştir. Acephate'ın 12,25; 24,5; 49; 98; 196 ve 392 mg/kg'lık dozları oral yollardan verilmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saat uygulama sürelerinin sonunda farelerden alınan kan örneklerinden yapılan comet testi ile DNA hasarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre comet kuyruk uzunluğu 24 ve 48 saatlik uygulama sonunda tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı artmış iken, 72 saatlik uygulama süresi sonuçlarına göre ise 98, 196 ve 392 mg/kg dozlarında anlamlıdır. En uzun uygulama süresi olan 96 saatlik sürede ise comet kuyruk uzunluğunun değerleri negatif kontrol değerlerine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Acephate'ın 24 ve 48 saatlik sürelerde genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [Rahman ve ark., 2002].

Organofosfatlı bir insektisit olan Chlorpyrifos'un comet testi kullanılarak fare periferik lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı araştırılmıştır. 24 ve 48 saat süreleri boyunca oral yollarla verilen uygulama dozları fare lenfositlerinde comet kuyruk uzunluğunda artışa neden olmuştur. Bu artışın doza bağlı olduğu belirlenmiştir [Rahman ve ark., 2002].

Ündeğer ve Başaran'ın (2005) yapmış oldukları çalışmada organofosfatlı insektisit olan metil paration ve dimethoate'ın insan periferik lenfositlerinde comet testi uygulanmış olup, DNA hasarı incelenmiştir. Dimethoate uygulanan tüm dozlarında (10, 50, 100 ve 200 µg/ml) kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu önemli düzeyde ve doza bağlı artırmıştır. Metil paration ise 10, 50 ve 200 µg/ml'lik dozlarda kuyruk uzunluğunda, 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda kuyruk yoğunluğunda artışa neden olmuştur. Kuyruk yoğunluğundaki artış doza bağlıdır [Ündeğer ve Başaran, 2005].

Malation ve onun iki metaboliti olan malakson ve izomalation insektisitlerinin DNA üzerine etkisi araştırılmıştır. Comet testi sonuçlarına göre malakson ve izomalation

kuyruk uzunluğunda önemli düzeyde doza bağlı bir artışa neden olmuştur [Blasiak ve ark., 1999].

Pestisitler çeşitli zararlıları öldürmek ve tarımda üretimin artırılması için kullanılıyor olsa da aşırı kullanımı çevre kirliliğine ve çeşitli yollarla canlılara ulaşarak sitolojik, mutajenik, klastojenik, anojenik ve kanserojenik etkilere neden olmaktadır. Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin KA, KKD, MN ve comet testleri kullanılarak genotoksik etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda bu insektisitlerin mitotik indeks, replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi etkileri incelenmiştir.

Sonuç olarak Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin insan lenfosit kültüründe uygulanan dozlarının kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekanslarında istatistiksel olarak önemli artışlara sebep olduğu ve DNA hasarını artırdığı belirlenmiştir. Buna göre her iki insektisit de klastojenik, mutajenik, anojenik etkiye sahiptir. DNA'da hasar olarak ortaya çıkan bu genotoksik etkiler kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle bu pestisitlerin kullanımda dikkatli davranılmalı, hedef alınmayan canlıların özellikle insanların bu kimyasal bileşiklere maruz kalması mümkün olduğunca azaltılmalıdır. Pestisitlerin tarım arazilerinde bilinçsizce kullanımının önüne geçilebilmesi için çiftçiler bilinçlendirilmeli ve pestisitlerin çevreye olan zararları açıklanmalıdır. Ayrıca toksisiteleri bu derece yüksek olan sentetik pestisitlerin yerine doğal pestisitler biyoinsektisitlerin kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. Örneğin *Bacillus thuringiensis* halen kullanılmakta olan biyoinsektisitlerin en tanınanı ve önemlisidir. Bakteriden fermentasyon yolu ile elde edilen toksik yapılar sadece hedeflenen organizma üzerinde etkili olmakta bunun dışında yakın akraba canlılara bile etki göstermemektedir. Bu günümüzde gelişen tarımsal savaşta son derece önemli bir özelliktir. Bunun yanında doğadan elde edilmiş olan bu bakterinin insanlara bir etkisinin olmaması, uygulamadan sonra hasat için bekleme süresinin ve kalıntı probleminin olmaması diğer önemli avantajlarıdır.

Ayrıca organik tarımın teşvik edilmesi ve tüketicinin organik ürünler hakkında bilgilendirilmesi gerekmektedir. Kimyasalların genotoksik potansiyellerini

belirlemede önemli bir ön gösterge olarak kabul edilen *in vitro* çalışmalara ilave olarak *in vivo* çalışmalar da yapılmalı ve kimyasalların etki mekanizmaları daha detaylı olarak belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “Genotoxicity study in offset printing workers” *J. Appl. Toxicol.*, 26: 10–15 (2006).
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D., Aitio, A., “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”, *Mutat. Res.*, 463: 111-172 (2000).
- Anderson, D., Human Biomonitoring, *Mutat. Res.*, 204: 353-541 (1988).
- Anonim, “Devlet Planlama Teşkilatı Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı Kimya sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu”, *Tarım İlaçları Alt Komisyonu Raporu*, Ankara, (2001).
- Anonim, “Ürün Çalışma Grubu'nun iyi tarım teknikleri uygulamaları (EUREPGAP)”. *Akdeniz Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği, ARGE Dış İlişkileri Şube Müdürlüğü Raporu*, (2004).
- Antunes, L. M. G., Pascoal, L. M., Bianchi, M. L. P., Dias, F. L., “Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures”, *Mutat. Res.*, 585: 113-119 (2005).
- Bağcı, H., Bağcı, G., Açıkbaş, B., Demir, G., “*In vitro* testing for genotoxicity of 4-CPA sister chromatid exchange in human lymphocytes culture”, *Turk. J. Med. Sci.*, 35: 75-78 (2005).
- Balaji, M., Sasikala, K., “Cytogenetic effect of malathion in *in vitro* culture of human periferal blood”, *Mutat. Res.*, 301: 13-17 (1993).
- Ballantyne, B., Marrs T. C., “Overview of the biological and clinical aspect of organophosphates and carbamates”, Clinical and Experimental Toxicology of organophosphates and Carbamates (Ed. B. Ballantyne and T.C. Marrs), *Butterworth-Heinemann Ltd.*, Oxford, 3-14 (1992).
- Barış, A., “Farklı tipteki pestisitlerin muhtemel mutajenitelerinin Ames/ salmonella/ mikrozom test yöntemiyle araştırılması”. Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon, 13–43 (2007).
- Behera, B. C., Bhunya, S. P., “Studies on the genotoxicity of asataf (acephate) an organophosphate insecticide, in a mammalian *in vivo* system”, *Mutat. Res.*, 223: 287–293 (1989).
- Bhunya, S. P., Jena, G. B., “Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide in the chick *in vivo* test system”, *Mutat. Res.*, 292: 231-239 (1993).

Bridges, C. B., "The translocation of a section of chromosome 2 upon chromosome 3 in *Drosophila*", *Anat. Rec.*, 24: 426 (1923).

Blair, A., Zahm, S. H., Agricultural exposures and cancer", *Environ. Health. Persp.*, 103: 205-208 (1995).

Blasiak, J., Kowalik, J., "Effect of Paraoxon-Methyl and Parathion-methyl on DNA in human lymphocytes and protective action of vitamin C", *J. Pestic. Sci.*, 55: 1182–1186 (1999).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", *Mutat. Res.*, 543: 251-272 (2003).

Boller, K., Schmid, W., "Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon", *Humangenetik*, 11 (1): 35–54 (1970).

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., "Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study", *Cancer Genet. Cytogen.* 79: 133-135 (1995).

Bozkurt, G., Abay, E., Ateş, İ., Karaboğaz, G., Türe, M., Savran, F.O., Palandüz, S., Temocin, K. İ., Algüneş, Ç., "Clastogenicity of selective serotonin-reuptake inhibitors", *Mutat. Res.*, 558: 137-144 (2004).

Brown, L. M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G. D., Cantor, K. P., Schuman, L. M., Burmeister, L. F., Van Lier, S. F., Dick, F., "Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota", *Cancer Res.*, 50: 6585-6591 (1990).

Bulut, H., Tamer, A., "Pestisit kullanımının azaltılması ile ilgili politika ve stratejiler", *II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu*, Ankara, 12-24 (1996).

Carrano, A. V., Natarajan A. T., "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutat. Res.*, 204: 379–406 (1988).

Carter, S. B., "Effects of cytochalasins on mammalian cells", *Nature*, 213: 261-264 (1967).

Carver, J. H., Bootman, J., Cimino, M. C., Esber, H. J., Kirby, P., Kirkhart, B., Wong, Z. A., MacGregor, J. A., "Genotoxic potential of acephate technical: *in vitro* and *in vivo* effects", *Toxicology*, 35: 125-142 (1985).

Chiu, B. C. H., Weisenburger, D. D., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Gapstur, S. M., Holmes, F., Burmeister, L. F., Blair, A., Agricultural pesticide use, familial cancer and risk of non-hodgkin lymphoma, *Cancer Epidem. Biomar.*, 13 (4): 525-531 (2004).

Collins, A. R., Dobson, V. L., Duinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., “The comet assay: what can it really tell us?”, *Mutat. Res.*, 375: 183-193 (1997).

Countryman, P. I., Heddle, J. A., “The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 41: 321-332 (1976).

Çakmak, G., “Trafik polisi ve taksi sürücülere hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-107 (2000).

Çelik, M., “Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferik lenfositlerinde sitogenetik etkileri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 15-67 (2003).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu D., Ergün M.A., Arslan O., Kasap R. “*In vitro* effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 20: 101-104 (2004).

Dağlıoğlu, N., “Akut Organofosfatlı Pestisit Entoksikasyonlarının Sıçanlarda Deneysel Olarak Gösterilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 8-20 (2004).

Das, P. G., Shaik, A. P., Jamil, K., “Cytotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide profenofos on cultured human peripheral blood lymphocytes” *Drug Chem. Toxicol.*, 29: 313-322 (2006).

Das, P. G., Shaik, A. P., Jamil, K., “Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides *in vitro* on human lymphocytes using DNA diffusion assay”, *Drug Chem. Toxicol.*, 29: 147-156 (2007).

Das, P. G., Shaik, A. P., Jamil, K., “Cytotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide acephate on cultured human peripheral blood lymphocytes” *The Intern. J. Toxicol.*, 5: (2) (2008).

Dean, B.J., Danford, N., “Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells”, (in: S. Venitt, J.M. Parry, Ed.), Mutagenicity Testing—a Practical Approach, *IRL Press*, Oxford, 187-232 (1984).

Delen, N., Tosun, N., “Fungisitlere dayanıklılığı önleyici stratejiler.” II. Ulusal Ziraî Mücadele İlaçları Sempozyumu, *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı*, 239-244 (1996).

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., “Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları”, **Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre**, 35-45 (2005).

Demir, H., “Methidathion ve triadimenol pestisitlerinin insan lenfosit kültüründeki genotoksik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara1-77 (2005).

Dikshith, T. S., Raizada, R.B., “Effect of pesticide on the endocrine systems. In.: T.S.S Dikshit (Ed): Toxicology of Pesticides in Animals” **CRC Press. Inc.**, Boca Raton Florida, 256–265 (1990).

Dolara, P., Salvadori, M., Capobianco, T., Torricelli, F., “Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture”, **Mutat. Res.**, 283: 113–118 (1992).

Echobichan, D. J., Toxic effects of pesticides “Casarett and Doull’s Toxicology” (Ed. C. D. Klassen)’de 5. Edition, **Mc. Graw- Hill Co.**, New York, 643-689 (1996).

Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J. C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S. B. Smit, L., “Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticides list”, **The Lancet**, 360: 1163-1167 (2002).

El-Sadek, L. M., Amin, A. W., “Cytological effects of the organophosphorus insecticides: cythane and cytolane on barley (*Hordeum vulgare* L.)”, **4. Egyptian Conference of Botany**, Ismaileyah, 16-19 (1985).

EPA, “Summary of OPP reduced- risk pesticides initavite”, US EPA, **Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre**, 2: 19-21 (1999a)

EPA, “Fiscal year 1999 work plan”, **USA EPA**, 4 (1999b).

Epel, D., “The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg”, **J. Cell Biol.**, 17: 315–319 (1963).

European Commission (EC), “Opinion on human and wildlife health effects endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods”, **Reports of the Scientific Committee on toxicity, ecotoxicity and environment (CSTEE)**, Brussel, (1990).

Evans, H. J., Neary, G. J., Williamson, F. S., “The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei”, **Int. J. Rad. Biol.**, 1: 230–240 (1959).

- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L., "The comet assay: a comprehensive review", *Mutat. Res.*, 339: 37–59 (1995).
- Fairbairn, D. W., Walburger, D. K., Fairbairn, J. J., O'Neill, K. L., "Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis", *Scanning* 18: 407-416 (1996).
- Farag, A. T, Eweidah, M. H., El-Okazy, A. M., "Reproductive toxicology of acephate in male mice", *Reprod. Toxicol.*, 14 (3): 457-462 (2000a).
- Farag, A. T., Eweidah, H., Tayelag, S. M., El-Sebae, A. H., "Developmental toxicity of acephate by gavage in mice", *Reprod. Toxicol.*, 14 (3): 241-245 (2000b).
- Fenech, M., "The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285: 35–44 (1993).
- Fenech, M., "The *in vitro* micronucleus technique", *Mutat. Res.*, 455: 81-95 (2000).
- Fenech, M., "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology", *Toxicology*, 181: 411-416 (2002).
- Fenech, M., Morley, A. A., "Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay", *Cytobios*, 43: 233–246 (1985a).
- Fenech, M., Morley, A. A., "Measurement of micronucleus method in human lymphocytes", *Mutat. Res.*, 147: 29–36 (1985b).
- Fenech, M., Morley, A. A., "Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation", *Mutat. Res.*, 161: 193–198 (1986).
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E. Y., "Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests", *Ecotox. Environ. Safe*, 61: 239–246 (2005).
- Ferguson, L., Denny, W. A., "Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilized resource in mutagenesis", *Mutat. Res.*, 331: 1–26 (1995).
- Ford, J. H., Schultz, C. J., Correll, A. T., "Chromosome elimination in micronuclei: a common of hypoploidy", *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 733-740 (1988).
- Garrett, N. E., Stack, H. F., Waters, M. D., "Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides", *Mutat. Res.*, 168: 301–325 (1986).

Garrett, N. E., Stack, H. F., Jackson, M. A., Waters, M. D., “Genotoxic and carcinogenic potential of anticholinesterase”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 15: 20–21 (1990).

Gedikli, S., “Kayseri ili içme sularında organoklorlu pestisit kalıntılarının belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kayseri, 4-17 (2001).

Giri, S., Prasad, S. B., Giri, A., Sharma, G. D., “Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*”, *Mutat. Res.*, 514: 223–231 (2002a).

Giri, S., Sharma, G. D., Giri, A., Prasad, S. B., “Genotoxic effects of malathion in chick *in vivo* micronucleus assay”, *Cytologia* 67: 53–59 (2002b).

Guadaño, A., González-Coloma, A., Peña, E., “Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 414: 1-7 (1998).

Gündüz, T., “Çevre sorunları” 160-175, Ankara, 1998.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., “Pestisitler”, *T.C. Sağlık Bakanlığı, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*, Ankara, 52: 169 (1997).

Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Høgstvedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsa, M., “Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage”, *Cancer Res.*, 54: 2919-2922 (1994).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., Reuterwall, C., “Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH)”, *Cancer Res.*, 58: 4117–4121 (1998).

Heddle, J. A., “A rapid *in vivo* test for chromosome damage”, *Mutat. Res.* 18: 187–190 (1973).

Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparrys, Mac Gregor, J. T., “Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291 (1991).

Helvacı, N. D., “Methidathion İnektisinin *Allium cepa L.* kök ucu hücrelerinde mitoz bölünme ve kromozomlara etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-13 (2003).

Hidalgo, A., Gonzalez Reyes, J. A., Navas, P., Garcia Herdugo, G., “Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham”, *Cytobios*, 57: 7–14 (1989).

Hour, T. C., Chin, L., Lin, J. K., “Comparative investigation on the mutagenicities of organophosphate, phthalimide, pyrethroid and carbamate insecticides by the Ames and Lactam tests”, *Mutagenesis*, 13: 157–166 (1998).

Högstedt, B., Karlsson, A., “The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used”, *Mutat. Res.*, 156: 229–232 (1985).

Hrelia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Vigagni, F., Cantelli-Forti, G., “Cytogenetic effects of metalaxyl on human and animal chromosomes”, *Mutat. Res.*, 369: 81-86 (1996).

Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T., Filipi, M., “Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 49: 360-367 (2008).

İnternet: Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü İstatistik Verileri, www.kkgm.gov.tr (2008).

İnternet: Ziraat Mühendisleri Odası, <http://www.zmo.org.tr/genel>.

Jain, A.K., Andsorbhoy, R.K., “Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides”. III. Concluding Remarks, *Cytologia*, 53: 427–436 (1988).

Jena, G.B., Bhunya, S.P., “Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephatean *in vivo* study in chicks”, *Mutagenesis*, 9: 319–324 (1994).

Jenner, P., Parkinson’s disease, pesticides and mitochondrial dysfunction, *Trends Neurosci.*, 24 (5): 245-246 (2001).

Ji, B. T., Silverman, D. T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G. M., Baris, D., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., Brown, L. M., Lillemoe, K. D., Schoenberg, J. B., Pottern, L. M., Schwartz, A. G., Hoover R. N., “Occupational Exposure to Pesticides and Pancreatic Cancer” *Am. J. Ind. Med.*, 39 (1): 92-99 (2001).

Johnson, M. K., “Organophosphorus and other inhibitors of brain neurotoxic esterase and development of delayed neurotoxicity in hens”, *Biochem. J.*, 120: 523-531 (1970).

Jones, D. C. L., Simmons, V. F., Mortelman’s, K. E., Mitchell, A. D., Evans, E. L., Jones, M. M., Riccio, E. S., Robinson, D. E., Kirkland, B. A., “*In vitro* and *in vivo* mutagenicity studies of environmental chemicals”, US EPA-600/1-84-003, *Office of Research and Development, Health Effects Research Laboratory Research Triangle Park NC NTIS Report*, No. PB 84-138973 (1984).

Karabay, N. U., Oğuz, M. G., “Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos”, *Genet. Mol. Res.*, 4 (4): 653-662 (2005).

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., “Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies”, *Mutat. Res.*, 463: 13–31 (2000).

Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A., “Pestisitler, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji”, *Medisan*, 235 (1998).

Kergommeaux, D. J., Grant, W. F., Sandhu, S. S., “Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba in vivo* root tip assay system”, *Mutat. Res.*, 124: 69–84 (1983).

Kirsch-Volders, M., Fenech, M., “Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/ apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes”, *Mutagenesis*, 16: 51–58 (2001).

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. “Report from the in vitro micronucleus assay working group” *Mutat. Res.*, 564: 97-100 (2003).

Klassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., “Casarett and Doull’s Toxicology: Basic Science of Poisons”, 6th Edition, *McGraw-Hill International Editions*, New York, 763–784 (2001).

Klaude M., Eriksson, S., Nygren J., Ahnström, G., “The comet assay: mechanisms and technical considerations”, *Mutat. Res.*, 363: 89-96 (1996).

Koester, S. K., Bolton, W. E. , “Differentiation and assessment of cell death”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37: 311–317(1999).

Kovganko, N. V., Kashkan, Z. N., “Advances in the synthesis of neonicotinoids”, *Russ. J. Org. Chem.*, 40 (12): 1709-1726 (2004).

Kurinny, A. I., “Comparative study of cytogenetic effect of different organophosphorous pesticides”, *Genetika*, 11: 64–69 (1975).

Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G., Gullberg, M., “Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis”, *Mol. Cell. Biol.*, 17: 5530–5539 (1997).

Hegarar, L., Puech, L., Fessard, V., Poul, J. M., Dragacci, S.,” Aneugenic potential of okadaic acid revealed by the micronucleus assay combined with the FISH technique in CHO-K1 cells”, *Mutagenesis*, 18: 293–298 (2003).

Lima P. D. L., Yamada, E. S., Costa, E. T., Pessoa, C. O., Rabenhorst, S. H. B., Bahia M. O., Lu, F. C., “Toxicity of pesticides” Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment, (Lu, F. C., Ed.), 2. Edition, **Hemisphere Publishing Corporation**, Washington, 277-292 (1991).

Lima, P. D. L., Yamada, E. S., Costa, E. T., Pessoa, C. O., Rabenhorst, S. H. B., Bahia, M. O., Cardoso, P. C., Santos, R. A., Smith, M. A. C., Burbano, R. R., “Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes”, **Genet. Mol. Res.**, 4 (4): 822–831 (2005).

Mader, S. S., Biology, **Mcgraw-Hill Company**, USA, 908 (1997).

Mahajna, M., Quistad, B. G., Casida, J. E., “Acephate insecticide toxicity: safety conferred by inhibition of the bioactivating carboxyamidase by the metabolite methamidophos”, **Chem. Res. Toxicol.**, 10: 64–69 (1997).

Marrs, T. C., Dewhurst, I., “Toxicology of pesticide”, General and Applied Toxicology, Ed. B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen, 2. Edition, **Macmillan Reference Ltd.**, New York, 1993-2012 (2000).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V, Decordier, I., Kirsch-Volders, M., “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”, **Biochimie**, 88 (11): 1515–1531 (2006),

Mathew, G., Rahiman, M. A., Vijayalaxmi, K. K., “*In vivo* genotoxic effects on mice of metacid 50, an organophosphorous insecticide”, **Mutagenesis**, 5: 147-149 (1990).

McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L, Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., Collins, A., “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review”, **Mutat. Res.**, 288: 47–63 (1993).

Morgan, T. H., “On the mechanism of heredity”, **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 94: 162–197 (1922).

Muranlı, F. D. G., “Kültürü yapılan insan lenfositlerinde triasulfuron’un genotoksik etkileri”, Doktora Tezi, **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Edirne, 2-19 (2006).

Natarajan, A. T., “Chromosome aberrations: past, present and future”, **Mutat. Res.**, 504: 3–16 (2002).

Natarajan, A. T., Obe, G., “Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenic assays” (In: Heddle, J. A., Ed.) New Horizons in Genetic Toxicology, **Academic Press**, New York, 171–313 (1982).

Ni, Z., Li, S., Liu, Y., Tang, Y., Pang, D., “Induction of micronucleus by organophosphorus pesticides both *in vivo* and *in vitro*”, *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 24(1): 82-86 (1993).

Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A. T., Martínez-López, W., Folle, G. A., Drets, M. E., “Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution”, *Mutat. Res.*, 504: 17-36, (2002).

Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., “Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay”, *Radiat. Res.*, 122: 69–72 (1990).

Olive, P. L., Frazer, G., Banath, J. P., Ferrarotto, C., McLean, J. R. N., McNamee, J. P., “Radiation induced apoptosis measured in TK6 human lymphoblast cells using the comet assay” *Radiat. Res.*, 136: 130–136 (1993).

Ostling, O., Johanson, K. J., “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 123: 291–298 (1984).

Öztürk, S., “Tarım İlaçları”, Genişletilmiş 2. Baskı, *Ak Basımevi*, İstanbul, 553 (1997).

Padmavathi, P., Prabhavathi, P. A., Reddy, P. P., “Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers”, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64: 155–160 (2000).

Palitti, F. C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., “Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cell of mice”, *Mutat. Res.*, 103: 191–195 (1982).

Parlak, Ş., ”Gıda koruyucu maddesi olan bifenil’in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 25-30 (2007).

Parry, E. M., Parry, J. M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, F., Hermine, T. F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J., “Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals”, *Mutagenesis*, 17 (6): 509–521 (2002).

Perry, A. S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., Perry, R. Y., “Insecticides in agriculture and environment: retrospects and prospects”, *Springer*, Berlin, Heidelberg, 261-270 (1998).

Plestina R., "Prevention, diagnosis and treatment of insecticide poisoning", *Geneva: WHO Report*, (1984).

Poovala, V. S., Kanji, V. K., Tachikawa, H., Salahudeen, A. K., "Role of oxidant stress and antioxidant protection in acephate induced renal tubular cytotoxicity". *Toxicology*, 46: 403–409 (1998).

Preziosi, P., "Natural and antropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assement", *Pure Appl. Chem.*, 70: 1617-1631 (1998).

Peitl, P., Sakamoto-Hojo, E., Cólus, T. S., "Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells", *Rev. Bras. Gen.*, 19 (4): 571-576 (1996).

Rahman, M. F., Mahboob, M., Danadevi, K., Banu B. S., Grover, P., "Assessment of genotoxic effects of Chloropyriphos and Acephate by the comet assay in mice leucocytes", *Mutat. Res.*, 516: 139–147 (2002).

Rehana, Z., Malik, A., Ahmad, M., "Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.)", *Mutat. Res.*, 367: 187–193 (1996).

Richard, F., Muleris, M., Dutrillaux, B., "The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females", *Mutat. Res.*, 316: 1–7 (1994).

Rooney, D., Czepulkowski. B. H., "Human Cytogenetic", *Oxford University Press*, New York, 269 (1992).

Rupa, D. S., Reddy, P. P., Reddi, O. S., "Cytogeneticity of quinalphos and methyl parathion in human peripheral lymphocytes", *Hum. Exp. Toxicol.*, 9: 385–387 (1990).

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., Sofuni, T., "Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes", *Mutat. Res.*, 504: 57-65 (2002).

Searle, C. E., "Chemical carcinogenesis", *American Chemical Society Monograph*, Washington, 1171-1207 (1984).

Sekihashi, K., Saitoh, H., Saga, A., Hori, K., Nakagawa, M., Miyagawa, M., Sasaki, Y. F., "Effect of *in vitro* exposure time on comet assay results", *Environ. Mutagen. Res. Commun.*, 25 (2): 83–86 (2003).

Sezer, B., "Metal içeren bazı pestisitlerin alevli atomic absorbisyon spektrometrisi ile tayini", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri*, Ankara, 10-30 (2002).

Simmon, V. F., Poole, D. C., Mitchell, A. D., Robinson, D. E., “*In vitro* Microbiological Mutagenicity and unscheduled DNA Synthesis Studies of 18 Pesticides, Final report SRI Project LSU-3493-NS, Contract No. 68-01-2458”, **USA EPA Report**, 156 (1978).

Singh, S., Lehmann-Grube, B., Goedde, H. W., “Cytogenetic effects of paraoxon and methyl-parathion on cultured human lymphocytes: SCE, clastogenic activity and cell cycle delay”, **Int. Arch. Occ. Env. Hea.**, 54: 195-200 (1984).

Singh, N. P., McCoy M. C., Tice R., Schnider E. L., “A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells”, **Exp. Cell Res.**, 175: 184–191 (1988).

Soheir, M., Amer, A. E., Fawzia, A. E., “Cytogenetic effects of the insecticides Gardona and Dursban”, **Mutat. Res.**, 279: 165–170 (1992).

Song, B. J., Veech, R. L. Saenger, P., “Cytochrome P450IIE1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics”, **J. Clin. Endocr. Metab.**, 71: 1036–1040 (1990).

Soykan, H., “Dichlorvos’un (DDVP) *Allium cepa* L. kök ucu meristem hücrelerinde mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü**, Aydın, 4-11 (2007).

Soloneski, M., González, N. V., Piaggio, M., Reigosa, M. A., Larramendy, M. L., “Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*”, **Mutagenesis**, 16: 487–493 (2001).

Soloneski, S., Reigosa, M. A., Molinari, G., González, N. V., Larramendy, M. L., “Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells”, **Mutat. Res.**, 656: 68-73 (2008).

Speit, G., Haupter, S., “On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substitute chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns”, **Hum. Genet.**, 70: 126–129 (1985).

Spassova, D., White, T., Singh, A. K., “Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats”, **Comp. Biochem. Phys. C**, 126: 79–89 (2000).

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M., “Evaluation of genetic effects of Apitol *in vitro* by measurement of sister chromatid exchange”, **Mutat. Res.**, 588: 152–157 (2005).

Surrales, J., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., “The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair”, *Mutat. Res.*, 342: 43-59 (1995).

Taylor, W. G., Vedres, D. D., Hall, T. W., “Capillary gas chromatographic determination of permethrin insecticide by trans esterification”, *J. Chromatog.*, 690: 123-129 (1997).

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F., “Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing” *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206–210 (2000).

Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A. M., Smith, M. T., “Genotoxicity of Malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of Malathion-exposed workers”, *Mutat. Res.*, 388: 85-95 (1997).

Tomlin, C.D.S. (ed.), “The Pesticide Manual’. 13th Ed.” *BCPC* (2003).

Topaktaş, M., Speit, G., “Profenofos insektisitinin insan lenfositlerinde sitogenetik etkileri”, *Türk. J. Med. Sci.*, 13 (2): 105-111 (1989).

Topaktaş, M., Speit G., “İnsan lenfositlerinde prometryn herbisiti ile SCE ve CA'nın indüklenmesi”, (Doğa), *Türk Biyo. Derg.*, 14 (2): 69-78 (1990).

Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., “Sitogenetik”, *Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji*, Adana, 23-36 (1995).

Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R., Carrano, A. V., Sister-chromatid exchange: second report of the gene-tox program, *Mutat. Res.*, 297: 101-180 (1993).

Tucker, J. D., Preston, R. J., “Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment”, *Mutat. Res.*, 365: 147–159 (1996).

Uslu, O., Türkman, A., “Su kirliliği ve kontrolü”, *T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi:1*, Ankara, 118-125 (1987).

Ünal, G., Gürkan, M. O., “İnsektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri”, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*, Ankara, (2001).

Ündeğer, Ü., “Pestisitlerin olası genotoksik ve immünotoksik etkilerinin değerlendirilmesi”, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 164-200 (2001).

Ündeğer, U., Başaran, N., “Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: Induction of DNA damage”, *Arch. Toxicol.*, 79: 169–176 (2005).

Valkova, V., Maidokova, E., Podsatvkova, S., Vlcek, D., “Mutagenic activity of phosmet, the active compound of the organophosphorus insecticide decemtionone EK 20 in *Salmonella* and *Sacchoromyces* assays”, *Mutat. Res.*, 302: 153–156 (1993).

Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, M., Volders, K., “The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens”, *Mutagenesis*, 4: 6-11 (1989).

Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., “The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity”, *Mutat. Res.*, 244: 95–103 (1990).

Van’t Hof, J., “The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem”, *Exp. Cell Res.*, 51: 167–176 (1968).

Viel, J. F., Chalier, B., “Bladder cancer among french farmers: does exposure to pesticides in vineyards play a part?”, *Occup. Environ. Med.*, 52: 587-592 (1995).

Vijayaraghavan, M., Nagarajan, B., “Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds”, *Mutat. Res.*, 321: 103–111 (1994).

Vries, H., “Mass mutations and twin hybrids in *Oenothera grandiflora* Ait.” *Bot. Gaz.*, 65: 377–422 (1918).

Von Leederbur, M. M., Schmid, W., “The micronucleus test: methodological aspects”, *Mutat. Res.*, 19: 109-117 (1973).

Vural, N., “Toksikoloji”, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 73: 342–373 (2005).

Waddel, B. L., Zahm, S. H., Baris, D., Weisenburger, D. D., Holmes, F., Burmeister, L. F., Cantor, K. P., Blair, A., “Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-hodgkin’s lymphoma among male farmers (United States)”, *Cancer Causes Control*, 12: 509-517 (2001).

Wang, T. C., Lin, C., Lo, L., “Genotoxicity of methoxyphosphinyl insecticide in mammalian cells”, *Zool. Stud.*, 42(3): 462-469 (2003).

Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby, A. G., Augustijn-Beckers, P. W., Burt, J. P., “The SCS/ ARS/ CES pesticide properties database for environmental decision-making”, *Rev. Environ. Contam. T.*, 123: 1–155 (1992).

Wild, D., “Mutagenicity studies on organophosphorus insecticide”, *Mutat. Res.*, 32: 133–150 (1975).

Yadav, J. S., Kaushik, V. K., “Studies on the genotoxicity of an organophosphorous pesticide baytex-1000”, *Int. J. Hum. Genet.*, 1: 19-25 (2002).

Yavuz, O., Şanlı, Y., “Halk sağlığı ve vektör kontrolünde kullanılan pestisidler, pestisit formülasyonları ve uygulama seçenekleri”, *I. Seminer Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri*, 24 (1999).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., “Genotoxic action of fungicide conan 5FL (hexaconazole) on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*”, *Russ. J. Genet.*, 44: 273-278 (2008).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 604: 53–59 (2006).

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., “Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*”, *Mutat. Res.*, 649: 155–160 (2008).

Zheng, T., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Zhang, Y., Blair, A., “Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-hodgkin lymphoma”, *J. Occup. Environ. Med.*, 43: 641-649 (2001).

Zijno, A., Marcon F., Leopardi, P., Salvatore, G., Carere, A., Crebelli, R., “An assessment of the *in vivo* clastogenicity of erythrosine”, *Food Chem. Toxicol.*, 32: 159–63 (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZKAN, Deniz
 Uyuğu : T.C.
 Doğum yeri ve tarihi : Ankara, 26.04.1982
 Medeni hali : Bekar
 e-posta : denizozkan@hitit.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. (Genetik)	2009
Lisans	Gazi Üniv. Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Çankaya 50. Yıl Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2000

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Görev
2008–	Hitit Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

Yüzbaşıoğlu D., **Özkan D.**, Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H., “Evaluation of Cytogenetic and DNA Damage Induced By The Organophosphate Insecticide Acephate” 37th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Basel, Switzerland, September 09-13 Eylül 2007.

Özkan D., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H., “Mephosfolan İnsektisitinin *In Vitro* Genotoksik Etkileri” XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.