

**LUNA EXPERIENCE SC-400 FUNGUSİTİNİN SIÇAN
KARACİĞER VE KAN DOKULARINDA GENOTOKSİK
ETKİSİNİN VE OKSİDATİF HASAR POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CUMA AKTAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
MART - 2017**

**LUNA EXPERIENCE SC-400 FUNGUSİTİNİN SIÇAN
KARACİĞER VE KAN DOKULARINDA GENOTOKSİK
ETKİSİNİN VE OKSİDATİF HASAR POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CUMA AKTAŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

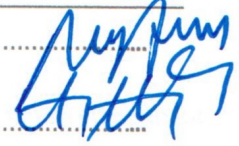
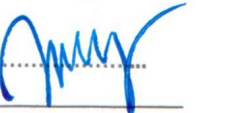
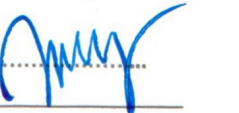
**Danışman
Prof. Dr. Ayla ÇELİK**

**İkinci Danışman
Prof. Dr. Serap YALIN**

**MERSİN
MART - 2017**

ONAY

Cuma AKTAŞ tarafından Prof. Dr. Ayla ÇELİK danışmanlığında ve Prof. Dr. Serap YALIN ikinci danışmanlığında hazırlanan "Luna Experience SC-400 Fungusinin Sıçan Karaciğer Ve Kan Dokularında Genotoksik Etkisinin ve Oksidatif Hasar Potansiyelinin Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 29/03/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Nurcan ARAS	
Danışman	Prof. Dr. Ayla ÇELİK	
Üye	Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.../04./2017. tarih ve 2017.529.../...17... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

29 Mart 2017 / 29 March 2017

İmza / Signature



Cuma AKTAŞ

ÖZET

LUNA EXPERIENCE SC-400 FUNGUSİTİNİN SIÇAN KARACİĞER VE KAN DOKULARINDA GENOTOKSİK ETKİSİNİN VE OKSİDATİF HASAR POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, fluopyram ve tebukonazol kombinasyonlu Luna Experience SC 400 fungusitinin sıçan karaciğer ve kan dokularında genotoksik etkileri ve oksidatif hasar potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada; genotoksik etkiyi belirlemek için Mikronukleus yöntemi ve oksidatif hasara bağlı DNA hasarını belirlemek için tek hücre jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Oksidatif hasar potansiyelini belirlemek için antioksidan enzimlerden biri olan katalaz (CAT) düzeyi ölçülmüştür. Lipit peroksidasyonunu belirlemek için ise malondialdehit (MDA) düzeyi ölçülmüştür. Sıçanlara verilecek olan dozlar, 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg olarak belirlenmiştir. Komet ve MN test yönteminde pozitif kontrol gruplarına 2 mg/kg Mitomycin-C (MMC) uygulanmıştır. Komet testi sonucunda elde edilen hasarlı hücre yüzdesi (HHY) ve genetik hasar indeksi (GHI) ve MN sonuçları istatistiksel açıdan doz artışına bağlı olarak anlamlı bir artış göstermektedir. CAT ve MDA değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen veriler Luna Experience SC 400 fungusitinin sıçan karaciğer ve kan dokularında genotoksik etkiye sebep olduğunu, CAT'a bağlı oksidatif hasar potansiyeli üzerinde bir etkisi olduğu, ancak MDA'ya bağlı oksidatif hasar potansiyeli üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fluopyram, Tebukonazol, komet, mikronükleus, katalaz, malondialdehit

Danışman: Prof.Dr. Ayla ÇELİK, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

İkinci Danışman: Prof.Dr. Serap YALIN, Mersin Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS AND OXIDATIVE STRESS POTENTIAL OF LUNA EXPERIENCE SC 400 FUNGUCIDE IN RAT LIVER AND BLOOD TISSUES

In this study, potential genotoxic effects and oxidative damage of Luna Experience SC 400 fungicide which is combined Fluopyram and Tebuconazole in rat liver and blood tissues was investigated. In this study; to determine the genotoxic effect, micronucleus assay was used, to determine DNA damage due to oxidative stress, single cell gel electrophoresis (comet assay) was used. To determine the oxidative stress potential of the Luna Experience SC 400, catalase level (CAT) which is one of the antioxidant enzymes were measured. To determine the lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) levels were measured. Doses of Luna Experience SC 400 which were given to rats were determined as 5 mg/kg, 10 mg/kg and 20 mg/kg. In the positive control groups for comet and MN assay, 2 mg/kg MMC was used. As a result of comet and MN assay, percentage of damage cells and arbitrary unit was statistically increased depend on doses. CAT and MDA levels were not changed statistically. The results of this study show that Luna Experience SC 400 fungicide has genotoxic effect and on CAT-dependent oxidative stress potential, but doesn't have MDA-dependent oxidative stress potential in rat liver and blood tissues

Keywords: Fluopyram, tebuconazole, comet, micronucleus, catalase, malondialdehyde.

Advisor: Prof.Dr. Ayla ÇELİK, Department of Biology, University of Mersin, Mersin.

Second Advisor: Prof.Dr. Serap YALIN, Department of Biochemistry University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi birikiminden faydalandığım ve her aşamada yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayla ÇELİK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap YALIN'a (Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı) teşekkür ederim.

Deney sonuçlarımın istatistiksel değerlendirmesinde yardımcı olan hocam Sayın Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN'e (Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Ana Bilim Dalı) teşekkür ederim.

Bu proje Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin 2015-TP2-1242 proje numarasıyla desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ediyorum.

Deneylerim süresince yardımlarından faydalandığım, laboratuvar arkadaşım Gizem GÜLER'e (Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), Arş. Gör. Erdi KESELİK'e (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi), Arş. Gör. Gonca AY'a (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi) teşekkür ederim.

Deney hayvanları laboratuvarı çalışanları Muhsin YAŞAR ve Emrah YAŞAR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hem maddi hem manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Tez sürecimin tamamında her zaman yanımda olan, manevi desteğini her zaman en iyi şekilde hissettiren değerli eşim Betül KILIÇ AKTAŞ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii-viii
TABLolar DİZİNİ	İx
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Pestisitler	4
2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması	7
2.2.1. Organofosfatlı Pestisitler	7
2.2.2. Karbamatlı Pestisitler	8
2.2.3. Organoklorinli İnektisitler	8
2.2.4. Sülfonilüre Herbisitler	8
2.2.5. Biyopestisitler	8
2.3. Fungusitler	10
2.4. Luna Experience SC 400 Fungusit	10
2.4.1. Fluopyram	11
2.4.2. Tebukonazol	12
2.4.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	12
2.4.2.2. Kimyasal Güvenlik ve Kullanım	13
2.4.2.3. İnsan Sağlığına Etkileri	13
2.4.2.4. Muhtemel İnsan Maruziyet Yolları	13
2.4.2.5. Emilim Dağılım ve Boşaltım	13
2.4.2.6. Çevresel Akıbet ve Maruziyet	14
2.4.2.7. Gıda Araştırma Değerleri	14
2.4.2.8. Klinik Etkiler	14
2.4.2.9. Çalışmalar	14
2.5. Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	15
2.6. Mikronükleus Yöntemi (MN)	20
2.7. Oksidatif DNA Hasarı	23
2.7.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Metabolitleri	23
2.7.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	24
2.7.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	24
2.7.1.3. Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)	24
2.7.2. ROT'ların Kaynakları	25
2.7.3. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)	26
2.7.4. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma (Andioksidan Savunma Sistemi)	27
2.7.4.1. Katalaz (CAT)	28
2.8. Sıçanlar	28
2.8.1. Davranış	29
2.8.2. Çevre ve Vücut Isısı	29
2.8.3. Dolaşım	30
2.8.4. Hematoloji	30
2.8.5. Karaciğer	31
2.8.6. Sindirim Sistemi	32

	Sayfa
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.1.2. Dokuların Hazırlanması	34
3.1.2.1. Kan Hemolizatlarının Hazırlanması	35
3.1.2.2. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması	35
3.1.3. Grupların Belirlenmesi	35
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Kan Hemolizatlarına Komet Yönteminin Uygulanması	36
3.2.2. Kan Hemolizatlarına MN Yönteminin Uygulanması	37
3.2.3. Karaciğer Homojenatlarına Komet Yönteminin Uygulanması	37
3.2.4. Karaciğer Homojenatlarına MN Yönteminin Uygulanması	37
3.2.5. Kan ve Karaciğer Dokularında Katalaz Enzim Düzeyinin Ölçülmesi	38
3.2.6. Kan ve Karaciğer Dokularında Malondialdehit Enzim Düzeyinin Ölçülmesi	38
3.3. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	40
4.1. Bulgular	40
4.1.1. Kan Hücrelerinde Uygulanan Komet Testi Sonucu Elde Edilen Değerler	40
4.1.2. Kan Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi Sonuçları	42
4.1.3. Kan Hücrelerinde Genetik Hasar İndeksi Sonuçları	43
4.1.4. Kan Hücrelerinde MN Testi Analiz Sonuçları	44
4.1.5. Kan Hücrelerinde Katalaz Ölçüm Testi Analiz Sonuçları	48
4.1.6. Kan Hücrelerinde Malondialdehit Ölçüm Testi Analiz Sonuçları	49
4.1.7. Karaciğer Hücrelerinde Uygulanan Komet Testi Sonucu Elde Edilen Değerler	49
4.1.8. Karaciğer Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi Sonuçları	52
4.1.9. Karaciğer Hücrelerinde Genetik Hasar İndeksi Sonuçları	53
4.1.10. Karaciğer Hücrelerinde MN Testi Analiz Sonuçları	54
4.1.11. Karaciğer Hücrelerinde Katalaz Ölçüm Testi Analiz Sonuçları	57
4.1.12. Karaciğer Hücrelerinde Malondialdehit Ölçüm Testi Analiz Sonuçları	58
4.1.13. Korelasyon Değerlendirmesi	59
4.2. Tartışma	61
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
EK-1 ETİK KURUL RAPORU	76
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. En tehlikeli ve Kalıcı 12 KOK (Kalıcı Organik Kirletici)	5
Tablo 2.2. Etki Ettikleri Türlerine Göre Bazı Pestisitler	9
Tablo 3.1. Katalaz Ölçümü Hazırlık Tablosu	38
Tablo 3.2. MDA Ölçümü Hazırlık Tablosu	38
Tablo 4.1. Komet testi sonucu elde edilen hasarlı kan hücreleri değerleri	41
Tablo 4.2. Hasarlı kan hücreleri verilerinden elde edilen HHY değerleri	42
Tablo 4.3. HHY değerlerinin ortalaması ve standart sapması	42
Tablo 4.4. Hasarlı kan hücreleri verilerinden elde edilen GHI değerleri	43
Tablo 4.5. GHI değerlerinin ortalaması ve standart sapması	44
Tablo 4.6. Kan hücreleri MN testi sonucu elde edilen MN ve PCE değerleri	45
Tablo 4.7. MN ve PCE değerlerinin ortalaması ve standart sapması	46
Tablo 4.8. Kan hücreleri katalaz değerlerinin ortalaması ve standart sapması	48
Tablo 4.9. Kan hücreleri MDA değerlerinin ortalaması ve standart sapması	49
Tablo 4.10. Komet testi sonucu elde edilen hasarlı karaciğer hücreleri değerleri	51
Tablo 4.11. Hasarlı karaciğer hücreleri verilerinden elde edilen HHY değerleri	52
Tablo 4.12. HHY değerlerinin ortalaması ve standart sapması	52
Tablo 4.13. Hasarlı karaciğer hücreleri verilerinden elde edilen GHI değerleri	53
Tablo 4.14. GHI değerlerinin ortalaması ve standart sapması	54
Tablo 4.15. Karaciğer hücreleri MN testi sonucu elde edilen MN değerleri	55
Tablo 4.16. MN değerlerinin ortalaması ve standart sapması	56
Tablo 4.17. Karaciğer hücreleri katalaz değerlerinin ortalaması ve standart sapması	57
Tablo 4.18. Karaciğer hücreleri MDA değerlerinin ortalaması ve standart sapması	58
Tablo 4.19. Korelasyon değerlendirme tablosu	59
Tablo 4.20. Kan hücrelerine uygulanan test sonuçları arasındaki korelasyon	60
Tablo 4.21. Karaciğer hücrelerine uygulanan test sonuçları arasındaki korelasyon	60
Tablo 4.22. Tüm komet sonuçları arasındaki korelasyon	60
Tablo 4.23. Tüm MN sonuçları arasındaki korelasyon	61
Tablo 4.24. Oksidatif stres test sonuçları arasındaki korelasyon	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Fluopyram'ın kimyasal yapısı	11
Şekil 2.2. Tebukonazol'ün kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. Komet testinin aşamaları	17
Şekil 2.4. Hasara uğramış DNA görüntüleri	19
Şekil 2.5. Hücrede mikronükleus oluşumu	21
Şekil 2.6. Mikronükleus oluşumuna sebep olan kromozomal hasarlar	21
Şekil 2.7. ROT'ların yararlı ve zararlı etkileri	26
Şekil 2.8. Çoklu doymamış yağ asidinden MDA'nın oluşumu	27
Şekil 2.9. Sıçanların anatomik yapısı	29
Şekil 2.10. Kan hücrelerinin oluşumu	30
Şekil 2.11. Sıçan karaciğerin lobları	32
Şekil 2.12. Kanın uzaklaştırıldığı bir sıçan karaciğeri fotoğrafı	32
Şekil 4.1. Kan hücrelerinden elde edilmiş komet görüntüleri	42
Şekil 4.2. Kan HHY değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	43
Şekil 4.3. Kan GHI değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	44
Şekil 4.4. PCE/Total eritrosit istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	46
Şekil 4.5. Kan dokusundan elde edilmiş MN görüntüsü	47
Şekil 4.6. Kan MN istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	47
Şekil 4.7. Kan katalaz istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	48
Şekil 4.8. Kan MDA istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	49
Şekil 4.9. Karaciğer dokusundan elde edilmiş komet görüntüleri	50
Şekil 4.10. Karaciğer HHY değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	53
Şekil 4.11. Karaciğer GHI değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	54
Şekil 4.12. Karaciğer MN değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	56
Şekil 4.13. Karaciğer dokusundan elde edilmiş MN görüntüsü	57
Şekil 4.14. Karaciğer katalaz istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	58
Şekil 4.15. Karaciğer MDA istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı	59

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ATP	Adenozin Tri-Fosfat
CAT	Katalaz
CPDA	Fenilendiamin
Cyt-B	Sitokalsin-B (Cytochalsin-B)
DAB	P-Dimetilaminobenzen
DDT	Dikloro Difeniil Trikloroethan
DEHP	2-Etileksplat
DMN	Dimetilnitrozamin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EZY	Entegre Zararlı Yönetimi
FDA	Food Drug Administration
GHI	Genetik Hasar İndeksi
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
GTÖ	Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
HCB	Heksaklorobenzen
HHY	Hasarlı Hücre Yüzdesi
KA	Kromozom Aberasyonu
LMA	Düşük erime noktalı agar (Low Melting Agarose)
mA	Miliamper
MDA	Malondialdehit
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NCE	Normokromatik Eritrositler
NK	Negatif Kontrol
NMA	Yüksek erime noktalı agar (Normal Melting Agarose)
PBS	Fosfat tampon tuzu (Phosphate Buffer Saline)
PCB	Poliklorlu bifenil
PCE	Polikromatik Eritrositler
PK	Pozitif Kontrol
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SCE	Sister-Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SF	Serum Fizyolojik
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbutirik Asit
TCA	Trikloro Asetik Asit
V	Volt

1. GİRİŞ

Pestisitler, insanoğlunun günlük olarak maruz kaldıkları önemli bir çevre kirleticisi grubunu temsil etmektedir. Bunlar başta tarımda yaygın olarak kullanılması nedeniyle muhtemelen yakın gelecekte de devam edecek ve artacaktır [1].

Pestisitler, MÖ 2000'den beri insanlar tarafından mahsüllerini korumak için kullanılmıştır. İlk bilinen pestisit, Antik Mezopotamya'da 4.500 yıl önce Antik Sümerler tarafından kullanılan kükürttür. 4.000 yıllık yazıtlar, zararlılara karşı kullanılan zehirli bitkilerden bahseder [2].

15. yüzyıla doğru, arsenik, civa ve kurşun gibi zararlı kimyasallar zararlıları yok etmek için mahsüllere uygulanmıştır. 17. Yüzyılda, nikotin ve sülfat, insektisit olarak kullanılmak üzere tütün yapraklarından elde edilmiştir. 19. Yüzyılda, Kasımpatı'dan elde edilen pyrethrum ve tropikal sebzelerin köklerinden elde edilen rotenone, doğal olarak elde edilen diğer iki pestisit olarak kullanılmıştır [3].

II. Dünya Savaşından sonra dünya yiyecek tüketiminin artışı sonucunda tarımda pestisitlerin kullanımı artış göstermiştir. Pestisitlerin kullanımı ve endüstriyel ürünlerin yaygınlaşmasından dolayı artan çevre kirliliği, besinlerin, suyun ve toprağın bu kimyasalların ve metabolitlerinin kalıntıları ile kirlenmesine neden olmuştur [4].

1950'lere kadar, arsenik bazlı pestisitlerin kullanımı daha yaygınken, Paul Müller'in çok etkili bir insektisit olan DDT'yi keşfetmesi pazarı hakimiyeti altına almıştır [5]. 1975'li yıllarda Birleşmiş milletlerde organofosfatlı ve karbamatlı pestisitlerin yerini almasına kadar, DDT gibi organoklorinli ürünler pazarda hakimiyet sağlıyordu. Daha sonra, Pyrethrin bileşikleri baskın insektisitler oldu. Herbisitler triazin ve diğer nitrojen bazlı bileşikler, 2,4-diklorofenoksiasetik asit gibi karboksilik asitler liderliğinde 1960'larda yaygınlaşmıştır [6].

Gerek insan sağlığı gerek besinlerin korunması bakımından ekonomik faydaları bulunan pestisitler, doğal parçalanmaya dayanıklı olmaları nedeniyle su, toprak ve hava kirlenmesine neden olmakta ve ekolojik sistemin dengesini bozmaktadırlar. Pestisitlerin çoğu hedef organizma için etkili olurken, hedef olmayan insan ve diğer canlılara da zarar vermektedir. Özellikle doğal parçalanmaya karşı dirençli olan ve yağ dokularında çözünebilen organoklorlu pestisitler biyo ekosistemde birikerek tüm canlılar için zararlı seviyelere ulaşabilmektedir [7,8].

Pestisitlerin toksisite çalışmaları sırasında farklı düzeylerde zararlı etkileri ortaya konduğundan bu etkileri ortaya çıkaran düzeyleri, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından alınma miktarına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada, bir toksinin (zehir) deney hayvanlarının %50'sini öldürmek için gerekli olan miktarı LD₅₀ (Lethal Dose 50 - Öldürücü Doz) ve LC₅₀ (Lethal Concentration 50- Öldürücü Yoğunluk) olarak ifade edilmektedir. Bunlarla birlikte LD₅₀-LC₅₀ değerleri tek bir doza dayanır ve test hayvanın vücut ağırlığının her bir kilosuna karşılık gelen pestisit miligramı olarak kaydedilir (mg/kg). LD₅₀-LC₅₀ değerleri, farklı etken maddelerin ve aynı etken maddeyi içeren farklı formülasyonların toksisitesini karşılaştırmak açısından çok faydalıdır. Bir pestisitın LD₅₀-LC₅₀ değerleri ne kadar düşüğe insanlar ve hayvanlar için toksisitesi ve tehlikesi o kadar yüksektir. Aynı miktarda kullanıldığında LD₅₀ değeri en yüksek olan pestisit en az tehlikeli olanıdır [9-11].

Pestisitlerin düşük dozlarda uzun süre maruziyeti sonucu kanser ve genotoksik etkiler meydana gelebilir ve genotoksik hasarın, karsinojenik risk için uygun bir biyogösterge olabileceği düşünülebilir. Bu yüzden pestisitlerin yaygın kullanımları sonucu halk sağlığı üzerine verecekleri zararlar endişe yaratmaktadır. Genotoksik hasarın izlenmesi, mesleki toksikoloji açısından pestisit uygulayıcılarının karşılaşılabilecekleri muhtemel maruziyeti, pestisit imalatı sırasında pestisitlerin solunması nedeniyle ve oluşabilecek deri kontaminasyonu sonucu gelişebilecek risk açısından işçilerin güvenliği hakkında bilgilendirilmesi önem kazanmaktadır. Pestisitlerin insan ve çevre üzerine olumsuz etkileri nedeniyle pestisitlerle yapılan çalışmaların sayısı günümüzde artmaktadır [12].

Pestisitlerin hedef organizmalar üzerinde spesifik toksisite göstermeleri istenirken aynı zamanda hedef olmayan, zararsız organizmalar üzerinde de toksisitelerinin minimum olması istenmektedir. Bu amaçla ilk sentez edilen maddelerin ikinci ve üçüncü jenerasyonları olarak isimlendirilen daha güvenilir maddelerin sentezi yapılmıştır. Ancak, her pestisitın belli bir toksisitesi vardır ve sağlık açısından tam güvenceli bir pestisit yoktur [13].

Ülkemizde denetimden yoksun, bilinçsizce ve hiçbir koruyucu önlem alınmadan kullanılan pestisitlerin, vücutta serbest radikallerin oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki dengeyi sağlayan antioksidan sistemi, katalaz aktivitesini azaltarak ve hücrelerde peroksidasyona yol açarak olumsuz etkilediği düşünülebilir. Bu durum meslek yaşamları daha uzun yıllar devam edecek ve buna bağlı olarak daha uzun yıllar pestisitlerin toksik etkisine maruz kalacak olan tarım işçilerinde kanser, çeşitli kalp hastalıkları, erken yaşlanma, artrit, katarakt gibi reaktif oksijen türevlerinin de rol oynadığı hastalıkların oluşma riskinin artmasına yol açmaktadır [14].

Pestisitlerle ilgili ilk ciddi eleştiri biyolog Rachel Carson'un 1962 yılında yayımladığı "Silent Spring" (Sessiz İlkbahar) adlı eseriyle olmuştur. DDT ve klorlu hidrokarbonların kalıcılığını, insan ve hayvanların yağ dokularında birikimini, hedef olmayan veya olmaması gereken türler üzerindeki toksik etkilerini, ekoloji ve insan sağlığıyla ilgili olumsuz etkilerini dile getirmiştir [15].

Amerika'da DDT kullanımı 1972 yılında yasaklanmıştır. Türkiye'de ise 1982'den sonra organoklorlu pestisit etken maddelerinden sadece DDT, HCH, endosülfan, heptaklor, quintozen ve taksofenin kısıtlı kullanımına izin verilmiştir. 1985 yılında endosülfan, quintozen ve toksafen dışındaki pestisit kullanımı yasaklanırken, 1989 yılında taksofen de kullanımı yasak olan organoklorlu pestisitler içinde yer almıştır [13].

Pestisitlerin düzenlenmesi için federal otoriteyi sağlayan ilk yasal düzenleme 1910 yılında yürürlüğe girmiştir [16]. ABD Çevre Koruma Kurumu 1970 yılında pestisit yasasını yayınlamasına ve 1972'de değişiklikler yapmış olmasına rağmen, 1950'den beri pestisit kullanımı 50 kat artmıştır ve günümüzde her yıl 2,3 milyon ton pestisit kullanılmaktadır [3].

Pestisitlerin %75'i gelişmiş ülkelerde kullanılmakta fakat gelişmekte olan ülkelerde de kullanımı artmaktadır [17].

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Pestisitler

Pestisitler, herhangi bir zararlıyı kendine çeken, baştan çıkararak ve daha sonra da tahrip eden maddelerdir. Biyositlerin bir sınıfıdır. Pestisitler bitkiyi genel olarak yabancı otlar, mantarlar ve böceklerden korumak amacıyla kullanılan bitki koruma ürünleridirler [18].

Tarım ilacı teriminin bu şekilde kullanımının böylesine yaygın olması pestisit teriminin genellikle bitki koruma ürünü ile eş anlamlı olarak değerlendirmesine neden olur ancak pestisit terimi, pestisitlerin tarım dışı amaçlar için de kullanılmasından dolayı daha geniş bir terimdir. Pestisit terimi, herbisit, insektisit, böcek büyüme düzenleyici, nematosit, termitisit, mollusit, piskisit (balık öldürücü), avisit (kuş öldürücü), rodentisit, bakterisit, böcek savar, hayvansavar, fungusit, dezenfektan türlerini içerir [19].

Genellikle pestisitler, zararlıları caydıran, etkisizleştiren, öldüren veya zararlının zararını yok eden kimyasal veya biyolojik bir ajandır (virüs, bakteri, antimikrobiyal veya dezenfektan). Hedef zararlılar, ürüne veya mülke zarar veren, rahatsızlığa neden olan, hastalık yayan veya hastalığa sebep olan böcekler, bitki patojenleri, yabancı otlar, yumuşakçalar, kuşlar, memeliler, balıklar, nematodlar ve mikroplardır. Pestisitlerin yararları olmalarına rağmen, insanlara ve diğer canlı türlerine karşı toksik etkileri gibi zararları da vardır. Stockholm Sözleşmesindeki Kalıcı Organik Kirleticiler maddesine göre, en tehlikeli ve kalıcı 12 organik kimyasalın (Tablo 2.1.) 9'u organoklorin pestisitlerdir [20,21].

Tablo 2.1. En tehlikeli ve Kalıcı 12 KOK (Kalıcı Organik Kirletici) [21,22]

Aldrin	Termitleri, çekirgeleri, mısır kurtlarını ve diğer böcekleri kontrol almak için toprağa uygulanan bir pestisitir.
Chlordane	Termitleri kontrol etmek için geniş bir yelpazede ve bir dizi tarımsal ürün üzerinde kullanılan geniş spektrumlu bir böcek öldürücüdür.
DDT	En iyi bilinen kalıtsal organik kirleticidir. DDT, İkinci Dünya Savaşında askerleri ve sivilleri sıtma, tifüs ve diğer hastalıklardan korumak amaçlı kullanılan bir insektisittir. Halen bazı ülkelerde sıtmayı önleme amaçlı sivrisinekleri öldürmek için kullanılmaktadır [23,24].
Dieldrin	Termitleri ve tekstil zararlılarını kontrol altına almada kullanılan bir pestisit. Dieldrin ayrıca böcek kaynaklı hastalıkları kontrol altına almada ve tarımsal alanlardaki böcekleri kontrol altına almada kullanılır.
Dioksinler	Bu kimyasallar, eksik yanma ve bazı zirai ilaçlar ve kimyasalların imalatı sırasında istenmeden üretilir. Metal geri dönüşümü ve kağıt ağartma işleri de dioksinleri serbest bırakabilir. Dioksinler ayrıca otomobil egsozlarında, tütün, tahta ve kömür dumanlarında da bulunur.
Endrin	Arpa ve pamuk yapraklarına spreyleme ile uygulanan bir insektisittir. Ayrıca kemiricileri de kontrol altına almada kullanılır.
Furanlar	Bu bileşikler de dioksinlere benzer şekilde meydana gelirler. Ayrıca ticari formda bulunan poliklorlu bifenil karışımlarında da bulunur.
Heptaklor	Toprakta böcek ve termitleri kontrol altına almada kullanılırlar. Yaygın bir şekilde, pamuk zararlılarını, çekirgeleri ve diğer tarım ürünü zararlılarını kontrol altına almada kullanılır. Sıtma taşıyan sivrisineklere karşı da kullanımı mevcuttur.
HCB	Tarım ürünlerine bulaşan mantarları kontrol altına almada kullanılırlar. Dioksin ve furanlar gibi bazı kimyasalların üretimi esnasında açığa çıkarlar.
Mirex	Özellikle ateş karıncaları olmak üzere karıncalara ve termitlere uygulanan bir insektisittir. Ayrıca plastik, kauçuk ve elektrik malzemelerinde yanmayı önleyici olarak kullanılırlar.
PCB	Bu bileşikler, endüstride ısı değişim sıvısı, elektrik transformatörü ve kapasitör olarak ve boya katkı maddesi, sızdırmazlık maddeleri ve plastikler olarak kullanılmaktadır.
Toxaphene	Pamuk, tahıl ürünleri, meyve, fıstık ve sebzelerde kullanılan bir insektisittir. Ayrıca büyükbaş hayvanlarda kene ve akarların kontrolünde kullanılırlar.

Tarımsal ekosistemler, doğal ekosistemlerin aksine insanların üretimi artırma çabaları nedeniyle çeşitli biçimlerde gübre, pestisit gibi birçok ek enerji katkısı ile bir anlamda yapaylaştırılmış ekosistemlerdir. Ekolojik açıdan bakıldığında tarımsal ekosistemler çoğunlukla tek bir bitki türüyle sınırlanmış yapıları yüzünden genellikle istikrarsız ve zayıf olarak kabul

edilmektedir. İşte böyle bir ekosistemde ürün kaybına neden olan zararlı, hastalık ve yabancı otlara karşı olan ilaçlamalarda atılan ilacın çok az kısmı hedef olan organizma için etkili olmakta geri kalan büyük kısmı ise hedef olmayan organizmalara ve toprağa ulaşmakta ya da çevredeki doğal ekosistemlere sürüklenmekte ve kalıntı nedeniyle kimyasal kirleticiler olarak değerlendirilmektedir [25].

Dünya genelinde pestisitler 1940'lı yıllardan beridir kullanılmaktadırlar. Ürünlerin ve çeşitli besin maddelerinin korunmasında topluma ekonomik yararlar sağlamaktadır. Ancak pestisitler besin maddelerimizi hastalıklardan korumakla birlikte çeşitli yollardan sofralarımızdaki besin maddeleri ile bizlere ulaşabilmektedir. Besin halkasının sonunda kalıntı konsantrasyonu fazla birikeceğinden predatör türler en fazla etkilenenlerdir. Biyolojik birikimle canlıların vücudunda yoğunlaşabilir. Pestisitler topraktan su kütleleri aracılığı ile sucul canlılara ve diğer organizmalara taşınabilmektedir. Pestisitler, %75-80 arasındaki bir oranda tarımda kullanılırken tarımın dışında ahşap koruyucu olarak, boyalarda, yapıştırıcılarda, çadır yapımında kullanılan kumaşlarda, kemiriciler ve vektörlerle savaşta ve endüstride kullanımı yer almaktadır [21,26,27].

Gıda ve Tarım Örgütü (GTÖ), pestisitleri, insanlara veya hayvanlara hastalık taşıyanlar da dahil olmak üzere, yiyeceklerin üretim, işlenme, depolama, taşıma ve pazarlamasına engel olan her türlü böceğin; tarım ürünleri, ağaç ve ağaç ürünleri ya da hayvan yemlerine zarar veren istenmeyen bitki ve hayvanların önüne geçmeyi, onları yok etmeyi ya da kontrol etmeyi hedefleyen ya da vücutlarındaki haşareleri, eklembacaklıları veya diğer böcekleri kontrol etmek için hayvanlara verilen madde ya da karışım olarak tanımlamıştır. Bu terim, bitki büyüme düzenleyicisi, yaprak dökücü ilaç, kurutucu, meyve inceltici veya erken düşmesini önleme maddesi olarak kullanılmak üzere tasarlanan maddeleri içerir. Ayrıca, ürünün depolanması ve taşınması esnasında bozulmadan korunması için hasat öncesi veya hasat sonrası mahsullere uygulanan maddeler olarak da bilinmektedir [28].

Birçok ülkede, pestisitlerin satışı ve kullanımı bir devlet kurumunun onayını gerektirir. Pestisit yönetmelikleri ülkeden ülkeye farklılık gösterse de pestisitlerin ve kullanıldığı ürünlerin ticareti uluslararası sınırlar içinde yapılır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (GTÖ) konferansında delegeler, ülkeler arasındaki düzenlemelerdeki tutarsızlıklarla başa çıkmak ve farklı ülkelere yönelik pestisit düzenlemesinin gönüllü standartlarını oluşturmak için Pestisitlerin Dağıtımı ve Kullanımı hakkında Uluslararası Davranış Kurallarını 1985 yılında kabul etmişlerdir [29]. GTÖ, yasanın pestisit tehlikeleriyle ilgili farkındalığı arttırdığını ve

pestisit kullanımını kısıtlamadan bilinçsiz kullanan ülke sayısını azalttığını iddia etmektedir.[30]

Pestisit güvenlik eğitimi ve pestisit uygulayıcı yönetmeliği, halkı pestisitlerin yanlış kullanımından korumak için tasarlanmıştır, ancak tüm yanlış kullanımları ortadan kaldırmaz. Pestisit kullanımının azaltılması ve daha az toksik pestisit seçilmesi pestisit kullanımından toplum ve çevre üzerindeki riskleri azaltabilir [30]. Zararlıları kontrol etmek için çoklu yaklaşımları kullanan entegre zararlı yönetimi (EZY) yaygınlaştığı rapor edilmiş ve Endonezya, Çin, Bangladeş, ABD, Avustralya ve Meksika gibi ülkelerde başarı ile kullanıldığı bildirilmiştir [17]. EZY'nin, bir eylemin bir ekosistem üzerinde daha yaygın etkilerini tanımaya çalıştığı, böylece doğal dengelerin bozulmadığı bildirilmiştir [30].

Sağlık ve çevre risklerini azalttığı düşünülen biyolojik ve botanik türevleri ve alternatifleri de içeren yeni pestisitler geliştirilmekte ve ayrıca, uygulayıcılar alternatif kontrolleri düşünmeye ve kimyasal pestisit kullanımını azaltacak yöntemleri benimsemeye teşvik edilmektedir. Pestisitler, belirli zararlıların yaşam döngüsünü hedef alır, çevreye duyarlı olabilecek şekilde oluşturulabilir [31].

2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler genellikle kontrol ettiği zararlıların türüne göre adlandırılırlar. Pestisitler aynı zamanda, mikroplar ve diğer canlılar tarafından zararsız bileşiklere parçalanacak olan biyolojik olarak bozunabilir haşere ilaçları veya parçalanmadan aylar veya yıllarca kalıcı olabilen haşere ilaçları olarak da düşünülebilir. Pestisitlerin aynı zamanda kimyasal böcek ilacı olduğu veya ortak bir kaynaktan veya üretim yönteminden türetildiği de bir gerçektir [32].

Kimyasal tiplerine göre bazı pestisitler şunlardır;

2.2.1. Organofosfatlı Pestisitler

Organofosfatlar, bir nörotransmitter madde olan asetilkolini düzenleyen asetilkolinesteraz enziminin aktivitesini bozarak sinir sistemini etkilerler. Organofosfatların çoğu insektisittir. 19. yy başlarında geliştirilmelerine rağmen etkileri 1932 yılında keşfedilmiştir. Etkileri, böceklerin yanı sıra insanlarda da görülen organofosfatlı pestisitler oldukça zehirlidir ancak kalıcı değildir [33].

2.2.2. Karbamatlı Pestisitler

Karbamatlı pestisitler asetilkolini düzenleyen bir enzimin aktivitesini bozarak sinir sistemini etkilerler. Etkileri genellikle düzeltilebilir. Karbamatlı pestisitlerin bir kaç alt grubu vardır [34].

2.2.3. Organoklorinli insektisitler

Daha önceki yıllarda çok yaygın bir şekilde kullanılan organoklorinli insektisitlerin bir çoğunun (DDT, chlordane, toxaphene), sağlık ve çevreye olan zararlı etkilerinden ve kalıcılıklarından dolayı kullanımı ve satışı yasaklanmıştır [35-37].

2.2.4. Sülfonilüre Herbisitler

Nikosulfuron, triflusülfüron metil, ve klorsülfüron, asetolaktat sentaz enzimini inhibe ederek bitkileri öldüren geniş spektrumlu herbisitlerdir. Aynı etkiyi elde edebilmek için 10 gr/ha'dan daha az sülfonilürat kullanılması yetiyorken 1960'lı yıllarda 1 kg/ha'dan fazla bitki koruma kimyasalı kullanılmıştır [38].

2.2.5. Biyopestisitler

Biyo-pestisitler, hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve bazı mineraller gibi doğal malzemelerden türemiş belirli pestisitlerdir. Örneğin, kanola yağı ve kabartma tozu pestisit uygulamalarına sahiptir ve biyolojik pestisit olarak kabul edilir. Biyo-pestisitler üç ana sınıfa ayrılır:

Mikrobiale pestisitler, bakterilerden, entomopatojen mantarlardan veya virüslerden (ve bazen bakterilerin veya mantarların ürettiği metabolitleri içerir) oluşurlar. Entomopatojenik nematodlar çok hücreli olmalarına rağmen genellikle mikrobiyal pestisitler olarak sınıflandırılır [39,40].

Biyokimyasal pestisitler veya bitkisel pestisitler zararlıları ve mikrobiyal hastalıkları kontrol eden (veya feromonlar açısından monitörize eden) doğal maddelerdir [41].

Tablo 2.2. Etki Ettikleri Türlere Göre Bazı Pestisitler [11]

Tipler	Etkiler
Algisit	Göllerde, kanallarda, yüzme havuzlarında, su tanklarında ve diğer alanlardaki algleri öldürmek için kullanılır.
Antifouling Ajanlar	Tekne tabanları gibi su altındaki yüzeylere tutunan organizmaları öldürmek için kullanılır.
Antimikrobiyal Ajanlar	Virüs ve bakteri gibi mikroorganizmaları öldürür.
Çekici Ajanlar	Böcek veya kemiriciler gibi zararlıları çeken ajanlardır. Zararlıların yemek için tercih ettiği gıdalar bu sınıfa girmez.
Biyositler	Mikroorganizmaları öldürür.
Dezenfektanlar	Cansız nesnelere üzerindeki hastalık yapıcı mikroorganizmaları öldürür.
Fungusitler	Mantarları öldürür.
Fumigantlar	Binalardaki veya topraktaki zararlıları öldürmek için gazlı veya buharlı olarak tasarlanmış pestisitlerdir.
Herbisitler	Yabani otları veya istenmeyen bitkileri öldürmek için tasarlanmış pestisitlerdir.
İnsektisitler	Böcekleri öldürür.
Mitisitler	Bitkiler ve hayvanlar üzerinden beslenen akarları öldürür.
Mikrobiyal Pestisit	Böcekler veya diğer mikroorganizmalar da dahil olmak üzere zararlıları öldüren veya inhibe eden pestisitlerdir.
Mollusitler	Salyangoz ve sülükleri öldürür.
Nematositler	Nematodları öldürür. (Bitki kökleriyle beslenen kurt benzeri mikroskopik organizmalardır)
Ovisitler	Böcek ve akarların yumurtalarını yok eder.
Feromonlar	Böceklerin çiftleşme davranışını bozan biyokimyasal maddelerdir.
Kovucular	Sivrisinek gibi böcekleri ve kuşları uzaklaştıran kimyasallardır.
Rodentisitler	Fare ve diğer kemirgenleri kontrol eder.

2.3. Fungusitler

Fungusitler, mantarları veya mantar sporlarını öldürmek için kullanılan biyosidal kimyasal bileşikler veya biyolojik organizmalardır [42].

Mantarlar tarımda ciddi zarara neden olabilir, bu da verimin, kalitenin ve kârın kritik kayıplarına neden olmaktadır. Fungusitler, hem tarımda hem de hayvanlardaki fungal hastalıklarla savaşmakta kullanılmaktadır. Mantarlar grubuna girmediği halde mantarların mekanizmasına benzer bir mekanizma ile bitkilere hastalık bulaştıran oomisetlerin kontrolünde de fungusitler kullanılmaktadır [43].

Fungusitler, koruyucu, translaminar ve sistemik olabilirler. Koruyucu fungusitler, bitki dokusuna alınmaz, sadece spreyn toplandığı yeri korur. Translaminar fungusitler, fungusitin üst püskürtülen yaprak yüzeyinden, alttaki püskürtülmemiş yüzeye yeniden dağıtılmasını sağlar. Sistemik fungusitler alınır ve ksilem kanalları vasıtasıyla yeniden dağıtılır. Bazı fungusitler, bir bitkinin tüm bölümlerine taşınır. Bazıları lokal sistemiktir ve bazıları yukarı doğru hareket etmektedir [44].

Sülfür, yaygın bir etken maddedir [45]. En düşük dozu %0,08 iken en yüksek dozu %0,5'tir. Toz halde olan fungusitler genellikle %90 oranında sülfür içerir ve bu doz oldukça zehirlidir. Fungusitlerdeki diğer aktif etken maddeler, neem yağı, biberiye yağı, jojoba yağı, *Bacillus subtilis* bakterisi ve yararlı bir mantar olan *Ulocladium oudemansii* 'dir.

Fungusit kalıntıları, insanların tüketimi için ayrılan yiyeceklerde en çok da hasat sonrası ürünlerde bulunmuştur [46]. Kullanımı yasaklanmış olan vinclozolin gibi bazı fungusitler insan sağlığı için zararlıdır. Ziram da sürekli kullanımda insanlar için zararlıdır [47].

2.4. Luna Experience SC 400 Fungusit

Luna Experience-SC 400 Fluopyram/Tebakonazol Kombinasyonlu yeni nesil bir fungusittir. Luna Experience-SC 400 Bayer Crop Science tarafından üretilen en yeni teknolojik ürünlerinden fluopyram ile etkisi defalarca kanıtlanmış tebukonazol'un karışımı ile farklı mekanizmaların bir araya getirildiği geniş spektrumlu, koruyucu ve tedavi edici yeni bir fungusit standardıdır [48].

Luna Experience SC 400 Fungusitine ait bazı özellikler şöyledir;

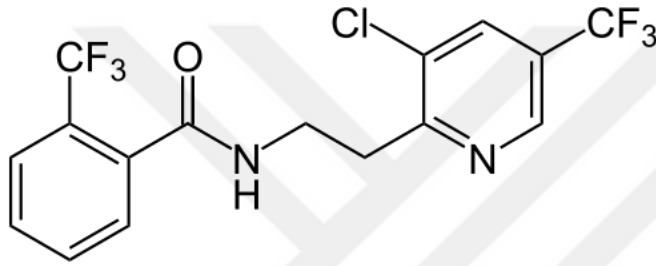
LD₅₀ Değeri: 2000 mg/kg

Formulasyonu: SC (Akıcı Konsantre/Süspansiyon Konsantre)

Aktif Madde: 200 g/L Fluopyram + 200 g/L Tebukonazol

2.4.1. Fluopyram

Fluopyram, Bayer Crop Science firması tarafından 2010 yılında geliştirilen bir pyridinyl-etil-benzamid fungusitidir. 70'den fazla ürünün patojenlerini kontrol altına almada etkili olan fluopyram, süksinat dehidrojenaz enzimini ve fungal solunum zincir kompleksini inhibe eden bir yapıya sahiptir. Birçok ülkede kayıtlara geçen Fluopyram, Çin'de de küflerin kontrolünde kullanılmaktadır [49,50].



Şekil 2.1. Fluopyram'ın Kimyasal Yapısı [51]

Kimyasal Formülü: C₁₆H₁₁ClF₆N₂O [51]

Molekül Ağırlığı: 396.72 g·mol⁻¹ [51]

pH = 6.6 (Distile suda %1'lik çözeltide) [51]

IUPAC Name:

N-(2-(3-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl)ethyl)-2 (trifluoromethyl)benzamide [51]

Fluopyram'ın kinetik davranışı ve metabolizması sıçanlarda incelenmiştir. Fluopyram, oral uygulamayı takiben gastrointestinal sistemden hızla emilir. Emilme oranı %93 ile %97,7 arasındadır. Gastrointestinal sistem tarafından emilimi takiben fluopyram geniş ölçüde dağıtılır. En yüksek kalıntıya sahip organlar karaciğer, böbrekler, bazı çalışmalarda ve daha az oranda eritrosit, adrenal, tiroid ve yumurtalıklardır. Toksikokinetikte cinsiyete özgü farklılıklar gözlemlenmiştir; Sistemik maruz kalma daha yüksek ve dişi bireylerde enterohepatik dolaşım daha belirgin olarak rapor edilmiştir. Uygulanan fenil fluopyramın % 90.6 -% 99.3'ü uygulamadan 168 saat sonra atılırken, uygulamadan 72 saat sonra verilen pridil etiketli fluopiramidin % 98'i idrar ve dışkılar yoluyla atılmıştır. Ancak, vücutta halen devam etmekte olan, böbrek atılımında oldukça yüksek radyoaktif kalıntılar nedeniyle boşaltım tamamlanmamıştır. Radyoaktif işaretlenmiş molekülün parçasına bağlı olarak toksikokinetik

verilerde dikkate değer farklılıklar vardır. Bu sonuçlar, fluopyramın moleküler bölünmesi ve iki etiketin özellikle idrar boşaltımı açısından farklı biyokinetik davranışları ile açıklanmıştır [51,52].

Subkronik çalışmalarda, ağırlık kaybı ve beslenme sorunları kaydedilmiştir. Köpeklerde tad alma sorunları kaydedilmiştir. Karaciğerin hedef organ olduğu tespit edilmiştir. Hepatoksisite doz artışına bağlı olarak belirginleşmiştir. Diğer bir hedef organın da kan hücreleri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kırmızı kan hücrelerinin parametrelerinde değişiklik ve trombosit sayısında artış görülmüştür [52].

2 yıllık çalışmada belirli bir sebep yokken 24 ayın sonunda özellikle erkek bireylerde ölümler meydana geldiği rapor edilmiştir. Dişi ve erkek bireylerin ortalama ağırlıklarında düşüşler kaydedilmiş, karaciğer ağırlığındaki artış çalışmanın hedef organının karaciğer olduğunu gösterdiği rapor edilmiştir [52].

2.4.2. Tebukonazol

Tebukonazol, meyve, sebze, pirinç, arpa ve buğdayda mantar kaynaklı küf ve pası kontrol altına almada kullanılan, triazol grubuna ait çok etkili bir fungusittir [53-56].

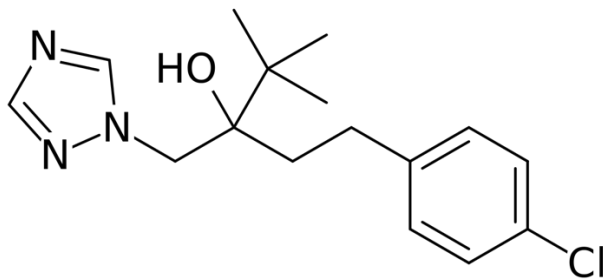
2.4.2.1. Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

Molekül Formülü: $C_{16}H_{22}ClN_3O$ [57]

Molekül Ağırlığı :307,83 gr/mol [56]

Renk: Renksiz kristal [56]

Erime Noktası: 105 °C [56]



Şekil 2.2. Tebukonazol'un Kimyasal Yapısı

2.4.2.2. Kimyasal Güvenlik ve Kullanım

Tebukonazolün steril koşullar altında yüksek sıcaklıklara ve saf suda fotoliz ve hidrolize kararlı olduğu rapor edilmiştir [58,59].

Tahıllarda, kara lekeye ve Septoria türlerine karşı etkili olduğu ve tohum korumasında etkili olduğu rapor edilmiştir. Pas, küf, yaprak hastalıklarına karşı etkili olduğu rapor edilmiştir [60].

Tanımlanan metabolitler arasında pentan zincirinin 5. karbonunun bir alkol ve daha sonra bir karboksil grubuna oksidasyonu birincil yol olmuştur. Bu metabolitler daha sonra sülfat veya glukuronit ile konjuge edilmiştir. Metabolik profil, metabolit ihtiva eden karboksil ile karşılaştırıldığında alkolün daha büyük yüzdesine kayma ile daha yüksek doz seviyesinde değiştirilmiştir [58,59].

2.4.2.3. İnsan Sağlığına Etkileri

Tebukonazolün Grup C Muhtemel İnsan Kanserojeni olduğu rapor edilmiştir [61].

2.4.2.4. Muhtemel İnsan Maruziyet Yolları

Tebukonazolün mesleki maruziyeti, tebukonazolün üretildiği veya kullanıldığı yerlerde dermal temaslarda görülebilir. Genel populasyon tebukonazole, tebukonazol uygulanmış tarım ürünlerinden dermal yolla veya bu ürünlerin gıda olarak tüketilmesiyle maruz kalınabildiği rapor edilmiştir [61].

2.4.2.5. Emilim Dağılım ve Boşaltım

Hayvan çalışmalarında, tebukonazolün 3 günde vücuttan idrar ve dışkı yoluyla %99 oranında atıldığı rapor edilmiştir [58,59].

Sıçanlarda yapılan çalışmada kullanılan tebukonazolün 72 saat sonra %91 ile 98 arasında vücuttan, idrar ve dışkı yoluyla atıldığı rapor edilmiştir. Cinsiyet gruplarıyla yapılan bu çalışmada erkek bireylerde idrar dışkı oranı 16/78 iken dişi bireylerde bu oran 30/62 olarak rapor edilmiştir. Safra atılımı yalnızca erkek bireylerde ölçülmüştür. Karaciğerden tek geçişten sonra yapılan bu ölçümde %90 oranında radyoaktif işaretli tebukonazole rastlanmıştır [58,59].

Sıçanlarda yapılan oral tebukonazol uygulaması çalışmasında, tebukonazolün %65-80'i safra ve dışkı yoluyla atılırken, %16-35'i idrar yoluya atıldığı rapor edilmiştir. Erkek bireylerin dışı bireylerden daha yüksek oranda safra ve dışkı attığı rapor edilmiştir [58,59,62].

2.4.2.6. Çevresel Akıbet ve Maruziyet

Tebukonazol üretimi, çeşitli atıkların atılımı yoluyla çevreye yayılabilir. Fungusit olarak kullanımı çevreye doğrudan yayılmasına neden olur. Tebukonazol eğer havaya salınırsa, atmosferde yalnızca partikül fazında bulunur. Partikül fazındaki tebukonazol atmosferden kuru veya ıslak çökme yoluyla atılır. Tebukonazol 290 nm'den büyük dalga boylarını absorbe eden kromoforlar içermez ve direkt güneş ışığından kaynaklı fotolize karşı kararlı olduğu gösterilmiştir. Tebukonazolün, buhar basıncından dolayı topraktan direkt olarak buharlaşması beklenmez. Çevresel koşullar altında hidroliz olabilen fonksiyonel gruplara sahip olmadığından hidroliz, tebukonazolün çevresel akıbet sürecinde değildir. Tebukonazolün saf suda hidrolize karşı da kararlı olduğu rapor edilmiştir [58,59,62].

2.4.2.7. Gıda Araştırma Değerleri

ABD ve yabancı kaynaklardan elde edilen tahıl, süt, balık, meyve, sebze ve hayvan yemi kalıntıları, 1995, 2000, 2002 ve 2003 yıllarında yapılan FDA (Food Drug Administration) izleme çalışmalarında analiz edilmiş, tebukonazolün varlığı tespit edilmiş fakat miktarı belirlenememiştir [58,59,62].

2.4.2.8 Klinik Etkiler

Kimyasalın kokusuna karşı akut maruziyetlerde genellikle çok güçlü olmayan başağrısı, baş dönmesi, zayıflık, mide bulantısı belirtileri rapor edilmiştir [59].

2.4.2.9. Çalışmalar

Sıçanlarda yapılan akut çalışmalarda, uyusukluk, lokomotor koordinasyon bozukluğu, yürüyüş bozukluğu ve zayıflama rapor edilmiştir [58,59,62].

Sıçanlarda yapılan subkronik bir çalışmada, 4 farklı gruba (0, 100, 400 ve 1600 ppm) 13 hafta boyunca %93,4 saflıkta tebukonazol uygulanmış ve sonuçlar rapor edilmiştir. Bir erkek ve

1 dişi bireyin çalışma sırasında öldüğü, yüksek doz grubunda gıda tüketiminin artmasına rağmen ortalama vücut ağırlığında düşüş görülmüş, karaciğer N-demetyhlase aktivitesi ve sitokrom P450 içeriğinde artış görülmüştür [58,59].

Farelerde yapılan kronik bir çalışmada, 4 farklı gruba (0, 20, 60 ve 180 ppm) 21 ay boyunca %94,7 saflıkta tebukonazol uygulanmıştır ve sonuçlar rapor edilmiştir. Tüm dozlarda karaciğerde yağ birikimi nedeniyle hedef organın karaciğer olduğu rapor edilmiştir [58,59].

Tebukonazol'un sıgır lenfosit kültürlerinde yapılan in vitro bir çalışmada, sitotoksik ve genotoksik etkileri çalışılmış ve elde edilen sonuçlar sitotoksikite ve genotoksikitenin arttığını göstermiştir [54].

Süt veren keçilerle yapılan bir çalışmada, metabolik yolun sıçanlarda bulunan yolla aynı olduğu rapor edilmiştir. En önemli metabolitler tert-bütül alkol türevleri olarak saptanmıştır [58,59].

%96,2 saflıkta tebukonazolün kullanıldığı sıçanlarda yapılan bir çalışmada, karaciğerin hedef organ olduğu, karaciğer ağırlığının arttığı ve serum enzim seviyelerinin arttığı belirtilmiştir. Karaciğerde lezyonlar görüldüğü rapor edilmiştir. En yüksek doz grubunda (1500 ppm) adenom ve karsinomların görüldüğü rapor edilmiştir [58,59].

Rhamdia quelen karaciğerinde yapılan Tebukonazol maruziyet çalışması sonucunda elde edilen veriler; Tebukonazol'un oksidatif hasar potansiyelini arttırdığı yönde etkisi olduğunu göstermiştir [63].

Cyprinus carpio'nun beyin ve karaciğer dokularında ve beyaz kas hücrelerinde yapılan Tebukonazol maruziyet çalışmasında TBA (Tiyobarbutirik Asit) miktarıyla beraber oksidatif hasar potansiyelinde de artış olduğu gösterilmiştir [64].

2.5. Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektrofrezisi)

Gen düzeyinde DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) kırıklarının tayini prensibine dayanan Komet yöntemi, pek çok DNA hasarının ve onarımının tayininde, biyoizleme çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın kullanım alanı bulmuştur [65,66].

Tek hücre jel elektroforezi adıyla da bilinen komet yöntemi, genotoksik ve sitotoksik hasarları belirlemek amacıyla son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir test yöntemidir. Komet, basit, hassas ve hızlı bir yöntem olduğundan genetik toksikoloji çalışmalarında oldukça kullanışlı ve tercih edilen bir yöntem olmuştur [67].

Komet yöntemi kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (SCE), mikronukleus (MN) gibi DNA hasarı belirlemede kullanılan sitogenetik test yöntemlerine göre bir dizi avantaja sahiptir;

- Çalışmanın yapılabilmesi için az sayıda hücre elde edilmesi yeterlidir.
- Test edilen hücrenin mitotik aktivitesi göz önünde bulundurulmaz.
- Oldukça fazla canlı grubunda kullanılabilir, çünkü hemen hemen herhangi bir tek çekirdekli bir hücre için kullanılabilir [68].

Genetik toksikoloji çalışmalarında ana amaç genetik hasarların belirlenmesi olduğundan, bu amaca hizmet edecek test yöntemlerinin geliştirilmesine dair çalışmalar süreklilik kazanmıştır. Bu amaçla geliştirilen çok çeşitli test yöntemleri mevcut olmakla birlikte son yıllarda üzerinde en çok çalışılan ve yaygın olarak kullanılanlardan birisinin komet tekniği olduğu görülmektedir. Komet Testi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir [65,66].

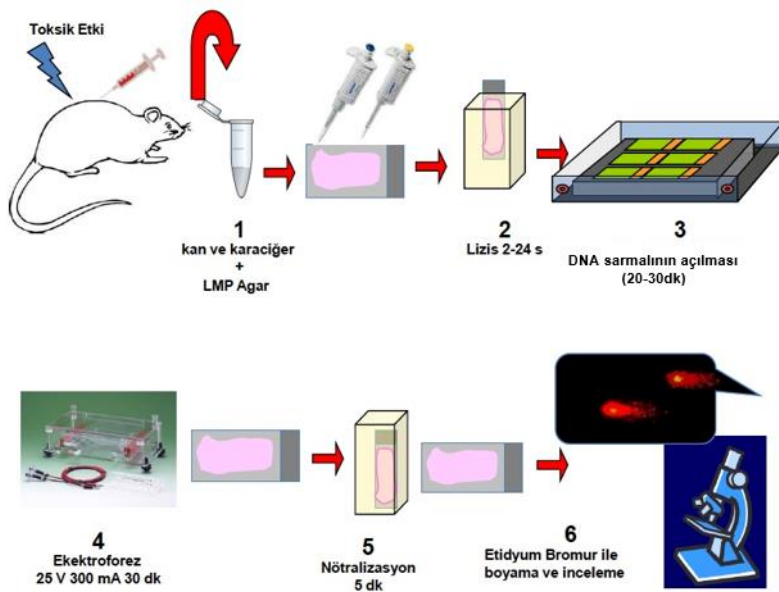
Hasara uğramamış olan DNA nükleus sınırları içerisinde kompakt bir yapı halinde bulunmaktadır. DNA'da bir hasar meydana geldiğinde bu yapıda bozulma meydana gelmektedir. Bu durumda bireysel DNA zincirleri yoğunlaşmış yapılarını kaybeder ve ana nükleus bölgesinden dışarı doğru uzanırlar. Bu yapıya bir elektrik akımı uygulandığında yapısı itibarıyla negatif yüklü olan DNA katoda (+ uç) doğru hareket etmektedir. Ana nükleusu oluşturan ve hasarlı olmayan DNA zinciri çok büyük olduğu için elektrik akımı ile hareket edip nükleus bölgesini terk edemeyip yerinde kalmaktadır. Diğer taraftan küçük fragmentler akım uygulama sürecine bağlı olarak ana DNA'dan ayrılarak hareket/göç edebilmektedir. Böylece ana nükleus bölgesini terk eden DNA'nın miktarı hücrede meydana gelen DNA hasarının miktarının göstergesi olarak kabul edilir [65,66].

Lam üzerinde agara gömülü haldeki hücrelerde DNA'nın negatif yüklü olan kırık uçları elektroforez işlemi esnasında pozitif elektrot tarafına doğru hareket ederler. Bunun sonucunda da floresan boyama ile gözlenebilen kuyruklu yıldız (KOMET/COMET) benzeri görüntüler meydana gelir [65,66].

Komet testinin özelliklerine bakıldığında;

- Pratikdir.
- Güçlüdür.
- Çok yönlüdür.
- Güvenilir, hızlı ve duyarlıdır.
- Analiz için az sayıda hücre yeterlidir.
- Göreceli olarak ucuz ve uygulaması kolaydır.
- Tek bir hücre düzeyinde elde edilen veriler oluşturur.
- Testin, yönetmeliklerde yer alabilirliği kabul edilmiştir.
- Hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere uygulanabilir.
- DNA onarım ve onarım kinetiğinin çalışılmasında da kullanılabilir.
- Sadece DNA hasarlarının varlığını belirlemekle kalmaz tipini de belirler.
- Kültüre alınmış hücreler ve direkt olarak canlıdan alınan hücrelere uygulanabilir.
- Prokaryotlardan ve ökaryotik organizmalardan bir çok hücre tipine uygulanabilir.

Komet testinin aşamaları [65,66] Şekil 2.5. te görülmektedir.



Şekil 2.3. Komet testinin aşamaları [69].

1. Preparasyon aşaması; Bu aşama, hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhalardan oluşmaktadır.

2. Lizis; Bu aşama agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarı ve proteinlerin yıkımını içermektedir. Böylece çıplak DNA elde edilir. Bu işlem için önceden

hazırlanan ve +4°C'de soğutulmuş olarak saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisindeki tuz; proteinler ve hücre ile olan bağlarını ve RNA (Ribo Nükleik Asit) yapısını bozmaktadır. Deterjanlar ise hücre membran yapısını bozar. Böylece lizis uygulaması sonucunda hücre yapısındaki membran, proteinler, RNA ile sitoplazmik ve çekirdek bileşenleri parçalanmaktadır. Bunun sonucunda da nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözleneceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.

3. DNA sarmalının açılması (Unwinding); Bu aşamada lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirilir ve tank soğuk elektroforez çözeltisi (pH: 13) ile doldurulur. Bu esnada DNA zincirleri ayrılarak tek iplik haline gelmektedirler. Böylece alkali şartlar altında yürütülen bu test alkali komet testi olarak adlandırılmaktadır.

4. Elektroforez aşaması; Bu aşamada unwinding işlemi tamamlanan preparatlara aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu esnada; tek iplik DNA üzerindeki kırık fragmentler ve kırılma ile oluşan DNA ilmekleri eksi (-) yüklü olmaları nedeniyle boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda artı (+) uca doğru hareket etmektedir.

5. Nötralizasyon; Elektroforez işlemi takiben tanktan çıkarılan preparatlar nötralizasyon işlemine alınmaktadır. Buradaki amaç pH ayarlamasını sağlamaktır. Bunun için preparatlar soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınmak ya da tamponu direkt olarak üzerlerine damlatmak suretiyle nötralize edilmektedir.

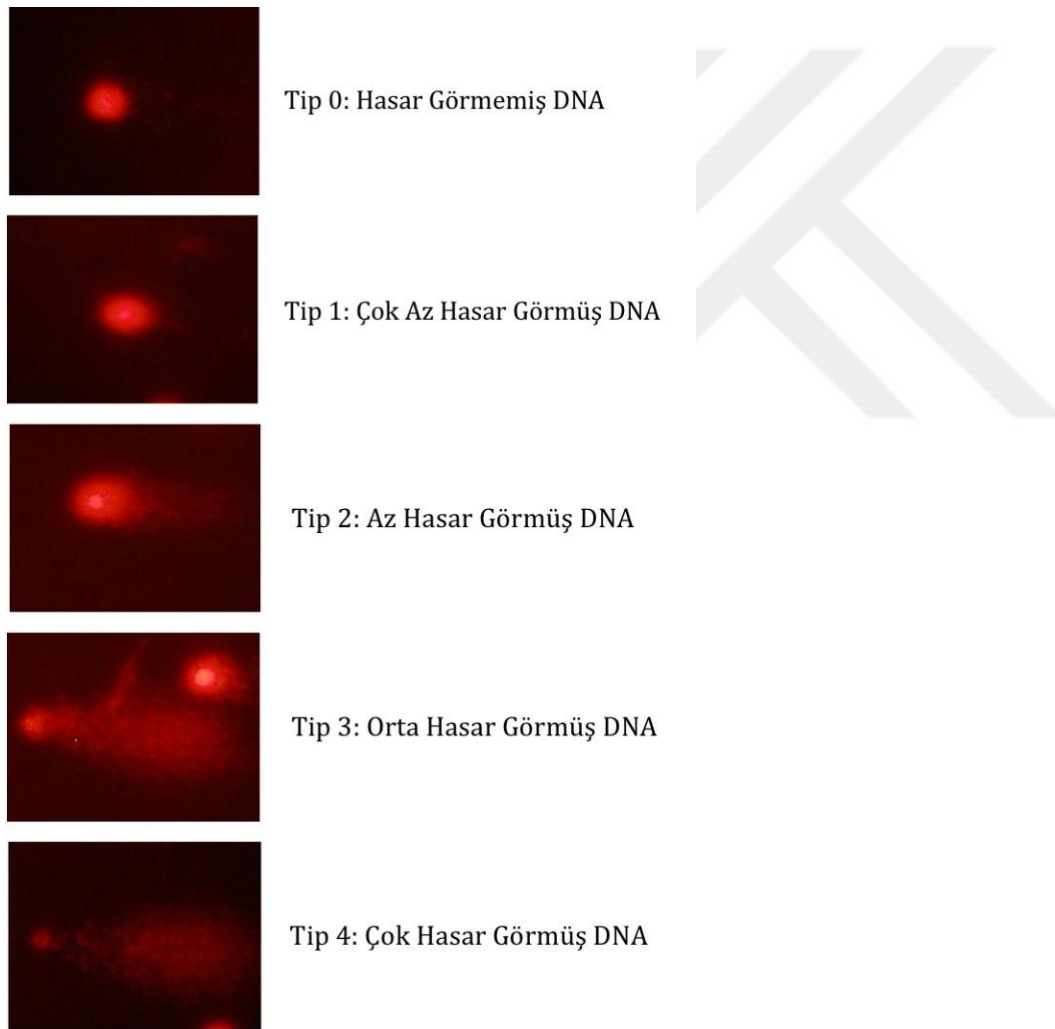
6. İnceleme: Nötralizasyon işleminden sonra preparatlar soğuk distile sudan geçirilir ve boyamaya alınmaktadır. Boyamadan hemen sonra elektron mikroskobu altında inceleme işlemi gerçekleştirilir.

Bu işlem için en yaygın kullanılan floresan boya Etidyum bromür'dür. Oldukça net görüntü sağlaması yanında yüksek oranda kanserojen olduğu için dikkatli bir biçimde kullanılmalıdır. Çok iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olan bu boya yerine kullanılacak alternatif boya tipleri (Akridin oranj, DAPI, YOYO-1, Propidyum iyodit) de bulunmaktadır. Bu alternatifler arasından en çok kullanılanlardan biri gümüş boyamadır. Floresan mikroskop göreceli olarak pahalı sayılabilecek bir ekipman olduğundan dolayı, gümüş boyama; kometleri ışık mikroskobu altında da görünür hale getirebilen bir yöntem olarak geliştirilmiştir [65,66].

Komet yönteminin analizi ise şu şekilde yapılır; Tipik bir komet baş ve kuyruk olmak üzere iki temel kısımdan oluşmaktadır. Komet ölçümlerinde, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Komet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye dayanan ölçümler ve

bilgisayarlı komet görüntü analiz programlarının kullanımı olmak üzere iki esas analiz yöntemi bulunmaktadır.

Kometin gözle (manuel) analizinde ise; Gözle değerlendirilmede hücreler hasarsız ve farklı düzeylerde hasarlı olarak gözle kategorize edilmektedir. Anderson ve Kobayashi tarafından geliştirilen ve uygulanan bu yöntemin hassasiyeti sonraki yürütülen çalışmalarla da desteklenmiştir. Ayrıca mikroskopta okülere yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanarak ölçüm yapmak suretiyle gerekli parametreler hesaplanabilmektedir. Gözle değerlendirme, hızlı ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay ve benzer hassasiyete sahip bir yöntemdir [65,66].



Şekil 2.4. Hasara uğramış DNA görüntüleri [70].

Gözle sayım, Tip 0 (kuyruk yok)'dan Tip 4 (hemen tüm DNA kuyruk bölgesindedir)'e kadar beş farklı kategoride incelenmektedir. Her örnek için 100 komet sayılır ve sayılırken her bir komet 0-4 arasında değer alır. Sonuçta toplam skor 0-400 arasında bir değer olarak

karşımıza çıkmaktadır. Gözle yapılan analize göre 5 sınıfa ayrılan kometlerin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerden iki tanesi hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksidir.

- Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY)= Tip 2 + Tip3 + Tip4
- Genetik Hasar İndeksi (GHI)= [Tip 1+ (2xTip2)+(3xTip3)+(4xTip4)]

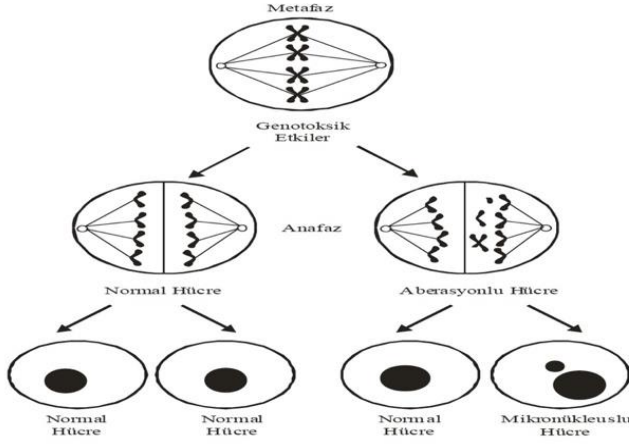
Bu tez çalışmasında komet hesaplamasında iki parametre değerlendirilmiştir.

Komet testinin esasları pek çok araştırmacı tarafından ayrıntılarıyla ortaya konmuş ve DNA'daki oksidatif hasarın belirlenmesinde geçerli bir belirteç olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır [65,66].

Sudheer tarafından sıçanlarda nikotinin sebep olduğu lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına karşı ferulik asitin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Nikotinin sebep olduğu tek zincir kırıkları komet testi ile araştırılmış ayrıca mikronukleus testi yapılmıştır. Nikotinin genotoksik etkisine karşı ferulik asitin anlamlı seviyede koruyucu etkiye sahip olduğu bulunmuştur [71].

2.6. Mikronükleus Yöntemi (MN)

Mikronukleus (MN) ana kromozomdan kopmuş olan parçacıklardan ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nukleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nukleusa ilaveten görülebilen küçük nükleustur. Mikronukleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. İğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenler de mikronukleus oluşumuna yol açabilmektedir. Eğer oluşuma kromozomlardan kopan bir parça neden olmuşsa (asentrik bir kromozom parçası), bu klastojenik bir olayın sonucu iken eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı oluşmuşsa, bu duruma anojenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Hücrede mikronükleus oluşumu [72].

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur.



Şekil 2.6. Mikronükleus oluşumuna sebep olan kromozomal hasarlar[72].

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü üzere genotoksik etkiler sonucunda metafazda gözlenen kromozomal fragmentler ya da tam kromozomlar, hücre bölünmesi bitiminde oluşan kardeş hücrelerden birinde tekrar kromatin halde kondanse olarak ana nukleus yanında küçük bir nukleus olarak kendilerini göstermektedir. Metafaz kromozomlarındaki kırılmalar sonucunda oluşan fragmentler ve deforme kromozomlar mitoz bölünme sonunda oluşan hücrelerde mikronukleus oluşumlarına yol açmaktadırlar [72,73].

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde [74,75] ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş [76] insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük, anojenler tarafından uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir [77-79].

Fenech ve Morley tarafından geliştirilen Sitokinez-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır [80,81]. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir.

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik bozulmanın güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Mavournin ve arkadaşları 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan MN test sonuçlarını toplayarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerlendirmeye almışlardır [82]. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid tarafından tanımlanan MN test protokolünün modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulanmıştır [83].

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanılmıştır. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlenmiş ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerilmiştir. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirilmiştir [84]. Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonize radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya koymuş ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğunu göstermiştir [85].

S.K. Roy ve ark. tarafından etkin bir hepatokarsinojen olan 1-4 Dioxin'in etkileri sıçan karaciğer ve kemik iliği dokularında araştırılmıştır. MN frekansındaki artış değerlendirilmiş ve anlamlı seviyede artış saptanmıştır [86].

Hiroshi ve ark. tarafından sıçan karaciğer ve kan dokularında hepatokarsinojen—4,4metilendianilin, kuinolin, o-toludin, 4-kloro-oEke, fenilendiamin(CPDA), dimetilnitrozamin (DMN), p-dimetilaminobenzen (DAB) ve 2-etileksplat (DEHP) kimyasallarının mikronukleus oluşturma frekansları araştırılmış kuinolin, DMN ve DAB karaciğer testinde, o-toluidine, kojic asit, DAB ve MMS peripheral kan da pozitif etki göstermiştir. Sonuçlar arasındaki korelasyon bu tekniğin geçerliliğini kanıtlamıştır [87].

2.7.Oksidatif DNA Hasarı

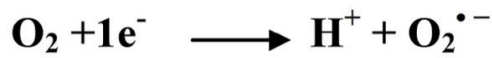
2.7.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Metabolitleri

Hücrelerde normal metabolik yollarda meydana gelen reaksiyonlarda ara ürünler olarak serbest radikaller meydana gelmektedir. Meydana gelen bu ara ürünler enzimlerin aktif bölgelerinden sızarlar ve kazara oksijen molekülleri ile birleşirler, böylece serbest oksijen radikalleri meydana gelir. Meydana gelen oksijen radikalleri vücudun savunma mekanizması olan antioksidan savunma sistemi ile ortamdan uzaklaştırılır. Ancak bazen hücrede antioksidan savunma sisteminin ortadan kaldırdığından daha fazla ROT (Reaktif Oksijen Türevleri) meydana gelir, bu dengenin bozulması durumunda hücrelerde oksidatif stres meydana gelir [88]. Serbest radikaller molekül yapılarında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulundurlar. Bu eşleşmemiş elektronlardan dolayı serbest radikaller yüksek derecede

reaktiviteye sahiptirler. Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), birincil reaktif oksijen türevidir, diğer moleküllerle etkileşime girebilir ve böylece başka ROT'lar üretebilir [89].

2.7.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

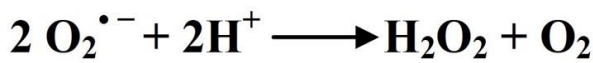
Süperoksit radikali, birincil ROT olarak da adlandırılır. Moleküler oksijenin yapısında bulunan paylaşılmamış tek elektronun reaktivitesi aracılığı ile bir elektron alması sonucunda meydana gelir. Bu durum hücre içinde ve hücre dışında ROT oluşumu ve yayılması için ilk adımdır. $O_2^{\bullet-}$, ROT öncüsüdür ve oksidatif zincir reaksiyonları için arabulucu olabilir [90].



Memeli hücrelerinde, oksijen fraksiyonu ile süperoksit radikali üretilir. Süperoksit radikalının üretilmesinde en önemli yol mitokondriyal solunum zinciridir. Mitokondriyal ATP (Adenozin Tri-Fosfat) üretimi, elektron taşıma zincirinde bulunan enzim komplekslerinde meydana gelir. Bu enerjinin dönüşümü sırasında dışarıya elektron sızır ve süperoksit radikalının oluşumu gerçekleşir [91].

2.7.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin oluşumu süperoksit radikalının dismutasyonu sonucunda gerçekleşir. Dismutasyon tepkimesi sonucunda H_2O_2 ve O_2 açığa çıkar.

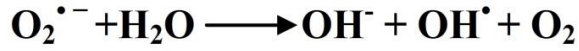


Süperoksit radikalının aksine, H_2O_2 molekülü stabil bir moleküldür ve hücre zarından geçebilir [91].

2.7.1.3. Hidroksil radikali (OH^{\bullet})

Hidroksil radikali yüksek oksidan gücüne sahip bir radikaldir. Bu özelliğinden dolayı çok tehlikeli bir radikaldir. Hatta en reaktif radikal olarak kabul edilebilir. Yarılanma ömrü çok kısadır (yaklaşık 10-9s.). OH^{\bullet} , oldukça reaktif olduğundan dolayı karşılaştığı ilk moleküle

reaksiyona girebilir. Bu yüzden oluştuğu an elimine edilirler. $O_2^{\bullet-}$ 'in Haber-Weiss reaksiyonuna girmesi sonucunda OH^{\bullet} meydana gelir.



Metal iyonları ve H_2O_2 moleküllerinin fenton reaksiyonuna girmesi sonucunda meydana gelir:

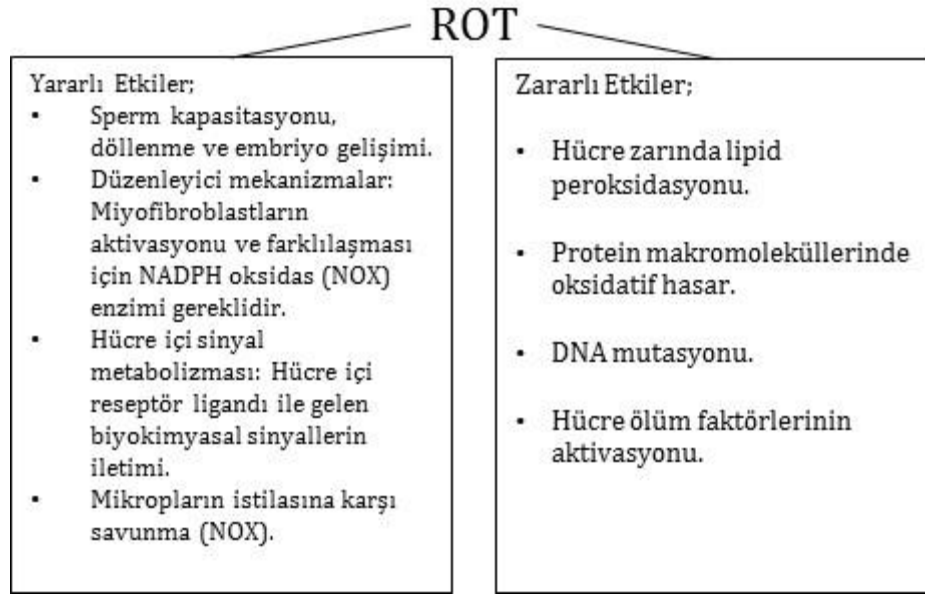


Ayrıca su moleküllerinin yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da OH^{\bullet} meydana gelir [90,91].

2.7.2. ROT'ların kaynakları

Hücrelerde normal metabolik yollarda meydana gelen enzimatik reaksiyonlarda ara ürünler olarak ROT'lar oluşmaktadır. Ancak en önemli oksijen radikali kaynağı mitokondriyal solunum sistemidir. Mitokondriyal solunum sistemi OH^{\bullet} ve H_2O_2 'nin ana kaynağıdır. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, hücrelerde ATP üretiminin gerçekleştirilmesi amacıyla son elektron alıcı olan O_2 'e elektron transferinin gerçekleşmesi işlemidir. Oksidatif fosforilasyon sırasında elektronlar $NADH^+$ gibi elektron vericisinden, elektron alıcısı olan O_2 'e redoks reaksiyonları ile transfer edilir. Mitokondriyal solunum sistemi yapısında 4 kompleks (kompleks IIV), koenzim Q ve sitokrom C bulundurur. Elektron taşınması sırasında kompleks I ve III'te OH^{\bullet} açığa çıkar. Bu durum, kompleks I'de meydana gelen hataların ROT üretimini artırdığını göstermektedir. NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, monooksijenaz ve sitokrom P450 gibi enzim yolları ekstra mitokondriyal ROT kaynaklarıdır. Mitokondriyal elektron transferinin yanı sıra hücrelerde farklı yollarla da ROT üretimi gerçekleşmektedir;

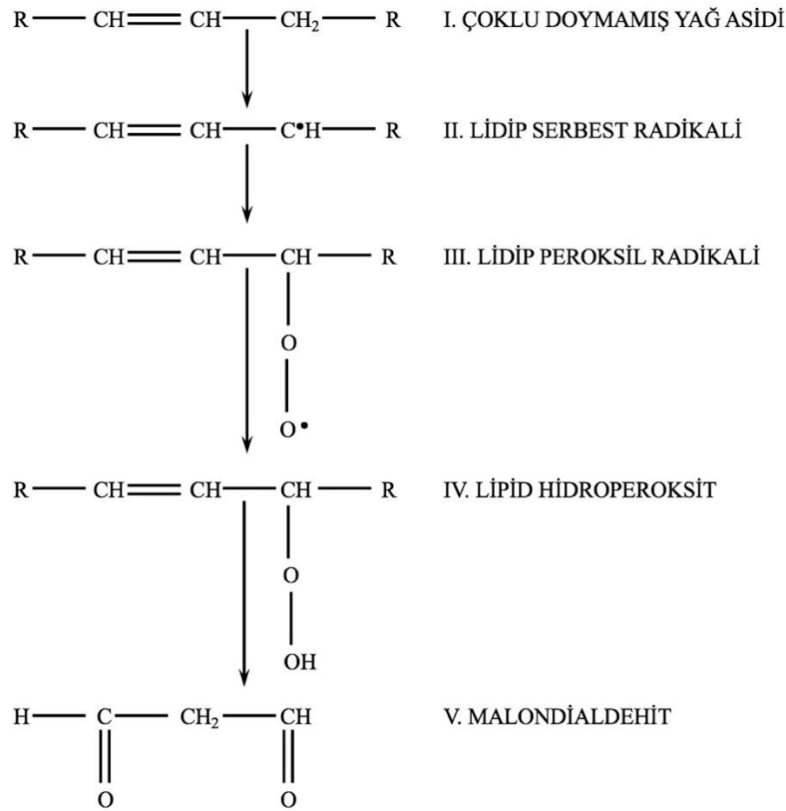
- Ksenobiyotikler ve ilaçların biyotransformasyonunda,
- İnflamasyon durumlarında,
- UV maruziyetinde,
- İyonik ışınlar sonucunda,
- Membran yapılarında meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucunda [90].



Şekil 2.7. ROT'ların yararlı ve zararlı etkileri [91]

2.7.3. Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu, hücre membranının fonksiyonu ve yapısal organizasyonunda önemli değişikliklere neden olur. Lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan ürünler DNA hasarına yol açtığından dolayı, aerobik organizmalarda lipit peroksidasyonunun önlenmesi önemli bir işlemdir [92]. Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucunda membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipit radikali özelliği kazanır. Lipit peroksidasyonu oldukça zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan membran yapısında, dolaylı olarak ise reaktif aldehitler üreterek diğer bileşenlere zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olmasından dolayı, reaksiyonların büyük bir kısmı membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi ciddi bir biçimde etkilenmektedir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon geçirgenliği, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nin neden mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklamaktadır [93].



Şekil 2.8. Çoklu doymamış yağ asidinden MDA'nın oluşumu [94]

2.7.4. Serbest Radikallere Karşı Hücrel Savunma (Antioksidan Savunma Sistemi)

Biyolojik sistemlerde enzimatik reaksiyonlar sonucunda sürekli olarak radikaller meydana gelmektedir. Meydana gelen bu radikallerin toksik etkilerinden hücreleri koruyabilmek için birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bu savunma mekanizmaları antioksidan savunma sistemi olarak adlandırılır [88].

Antioksidanlar etkilerini 4 ayrı şekilde göstermektedir:

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirerek gerçekleşir.
2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek gerçekleşir.
3. Zincir kırıcı etki: Oksijen radikallerini bağlayarak, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek gerçekleşir.
4. Onarıcı etki: Oksijen radikallerinin oluşturdukları hasarı onararak gerçekleşir.

Hücrelerde meydana gelen radikal ürünlere karşı görev alan antioksidanlar

enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki sınıfta incelenir:

1. Enzimatik antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon s-transferaz (GST), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

2. Enzimatik olmayan antioksidanlar: C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol), A vitamini, flavonoidler, melatonin, ürik asit, albumin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferin, ferritin, oksipurinol, ubikinon, bilirubin, mannitol, glutasyon [95].

2.7.4.1. Katalaz (CAT)

CAT, H_2O_2 'in su ve oksijene ayrışmasını katalizleyen bir antioksidan enzimdir.



CAT, tüm ana organlarda bulunan bir enzimdir ancak özellikle karaciğerde daha yoğun bulunmaktadır. Esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur, yapısında dört hem grubu bulunduran bir hemoproteindir [96].

2.8. Sıçanlar

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Mammalia

Takım: Rodentia

Familya: Muridae

Cins: Rattus

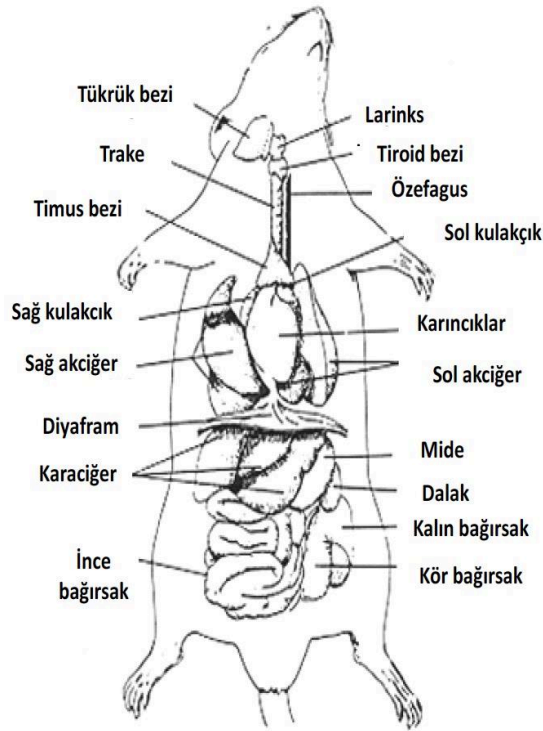
Tür: *Rattus rattus* ve *Rattus norvegicus*

Sıçanlar birçok fizyolojik ve farmakolojik çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin nedeni çabuk üreyebilmesi, deney uygulamalarında kullanımının ve bakımının kolay olması ve kısa sürede genetik açıdan benzer nitelikte gruplar oluşturulabilmesidir. Gibbs ve ark. tarafından sıçanın genetik haritasının çıkarılmasının ardından genetik çalışmalarda da çok fazla tercih edilen bir laboratuvar hayvanı haline gelmiştir [97].

Sıçanlar tüysüz, gözleri ve kulak kanalları kapalı olarak doğarlar. Yavru sayısı ve doğum ağırlığı birbiriyle ters orantılıdır. Kulak kanalı 2,5-3,5 günlükken, gözler 14-17 günlükken açılır.

Hayvanlar 7-10 günlük yaşa ulaştıklarında tüyleri tümüyle çıkmış olur. Sütten kesilme 21. günde şekillenir. Bu yaştaki sıçan yavruları su içmeye ve yem tüketmeye başlamışlardır. Dişilerde fertilité 7-9 aylık yaşa ulaştıklarında azalmaya başlar. Erkeklerin üreme yetenekleri dişilere göre daha uzun sürer fakat iki yaşına yaklaşmış erkek sıçanda üreme yeteneği azalmaya başlamıştır [98].

Bizim çalışmamızda kullandığımız sıçanlar 12 aylık dişî sıçanlardır. Şekil 2.9'da kullanılan sıçanların anatomik yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Sıçanların anatomik yapısı.[69]

2.8.1. Davranış

Sıçanlar nokturnal hayvanlar olduklarından, daha çok gece ve sabaha doğru aktivite gösterirler. Gün ışığı almayan odalarda barındırılan sıçanların ışık-karanlık döngüleri değiştirilerek hayvanların gündüz aktif olmaları ve böylelikle araştırmacılarla aynı zamanda uyanık kalmaları sağlanabilir. Bu değişimin gerçekleşebilmesi için iki haftalık bir uyum süresi gereklidir [98].

2.8.2. Çevre ve Vücut Isısı

Sıçanlar 10 °C ile 30 °C arasındaki çevre sıcaklıklarına uyum sağlayabilirler. Ancak

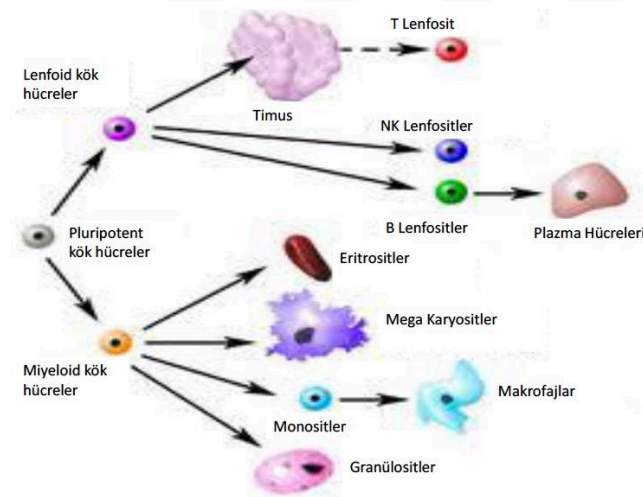
sıçanlar için optimal çevre sıcaklığı 20 °C ile 26 °C arasındır. Erkek sıçanların yüksek çevre sıcaklıklarına (31,6 °C - 32,5 °C) maruz kalması geri dönüşümsüz testis harabiyetine, dişilerde ise laktasyonun normal seyrinin bozulmasına neden olabilmektedir [98,99].

2.8.3. Dolaşım

Diğer memelilerden farklı olarak ve balıklardakine benzer şekilde kalbin ekstrakoroner damarlarla da bağlantısı söz konusudur. Kalp kası aksiyon potansiyeli kalp atım sayısı fazla olan hayvanlarda daha kısa süreli şekillenmektedir. İnsanda kalp kası aksiyon potansiyeli 200-500 milisaniye iken sıçanlarda kalp kası aksiyon potansiyeli yaklaşık 100 milisaniye'dir [98,100].

2.8.4. Hematoloji

Hematopoezis, kemik iliği ve dalakta gerçekleşir (Şekil 2.10.). Kemik iliğinde olgunlaşan granüositlerde sıçanlara özgü olarak yüzük formunda ortası delik hücrelere rastlanır. Yüzük görümlü granüositler, myelosit ve metamyelosit arasında bir geçiş formudur. Kalpten alınan kan örnekleriyle karşılaştırıldığında kuyruk venasından alınan kan örneklerinde akyuvar sayısı belirgin olarak yüksektir. Kan parametrelerine dair en tutarlı değerlerin sağ kalpten alınan kanda yapılan ölçümlerde elde edildiği bildirilmektedir [101-104].



Şekil 2.10. Kan hücrelerinin oluşumu[69]

Polikromatik eritrositler (PCE) gelişimlerinin ara aşamasında olan, olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında hâlâ ribozom bulundurlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı, gelişimlerini tamamlamış olgun normokromatik eritrositlerden (NCE) ayırt edilebilirler. NCE'ler ışık mikroskobunda mavi-yeşil arası bir renkte görülürken, daha büyük olan PCE'ler sarımsı turuncu renkte görülmektedirler [105]

2.8.5. Karaciğer

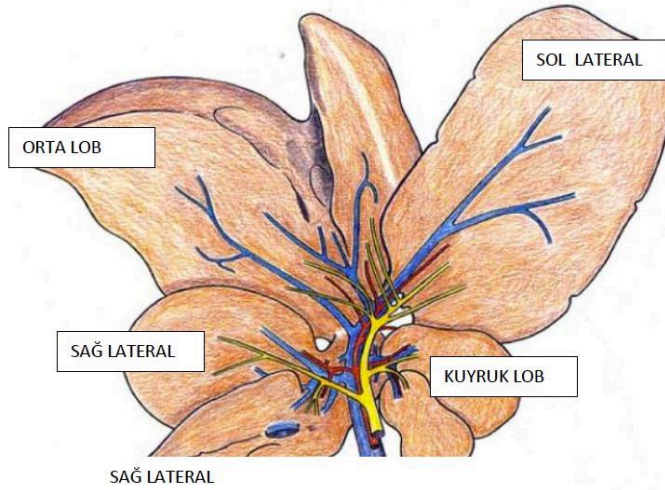
Bu tez çalışmasında kullanılan diğer bir doku ise sıçan karaciğeridir.

Karaciğer; proteinlerin üretilmesi ve depolanması, protein metabolizmalarının birçok yan üretimlerinin tanzim ve kontrol edilmesinden sorumlu organdır. Bunların yanı sıra;

- Şekerin depolanması ve kanda bulunması gereken şeker miktarının ayarlanması.
- Vücuttaki toksik maddelerin nötralize edilmesi.
- Depo edilmiş yağların kullanılması.
- Kanın pıhtılaşması için gerekli maddelerin üretilmesi.
- Safra ve safra tuzlarının üretilmesi.
- Kırmızı kan hücreleri ve başka kan elemanlarının üretimi için gerekli ve önemli olan maddelerin üretimi ve depolanması.
- Safra salgılanması.
- Vücut ısısının ayarlanması,
- Vücudun ihtiyacı olan su ve vitaminlerin dengesinin sağlanması,
- Kan miktarının ayarlanması,
- Hormonların görevleri üzerinde belli etkiler gibi pek çok görevi bulunmaktadır.

Bütün bunlar insan karaciğerinin, sıçan karaciğeri ile görev bakımından ortak olan özellikleridir. Görev bakımından sıçan ve insan karaciğeri benzer özelliklere sahip olsa da morfolojik açıdan bazı farklılıkları bulunmaktadır. İnsan karaciğeri tek lobdan meydana gelirken sıçan karaciğeri dört lobdan meydana gelmektedir. Ancak bu loblar arasında görev dağılımı bakımından bir farklılık bulunmamaktadır.

- Orta veya sistik lob: Merkezde yarıktır.
 - Sol lateral lob: Büyüktür ve kısmen açıklıklar vardır.
 - Sağ lateral lob: Anterior ve posterior olmak üzere kısmi bir ayrışımı vardır.
- Orta lob tarafından gizlenmiştir.
- Uç yada kuyruk lob: Küçüktür, mide ve özefagus tarafına çok belirgin bir kıvrım yapar (Şekil 2.11. ve 2.12.).



Şekil 2.11. Sıçan karaciğerin Lobları [69]



Şekil 2.12. Kanın uzaklaştırıldığı bir sıçan karaciğeri fotoğrafı [69]

2.8.6. Sindirim Sistemi

Yarığı olan bir üst dudağa ve tam bir alt dudağa sahiptir. Her iki çenede de iyi gelişmiş kesici dişler bulunur.

Özefagusun mideye girdiği noktada, ön mide ve bezsel mideyi ayıran anatomik sınırın yarattığı katlanma nedeniyle sıçanlar kusamazlar. Sıçanların bu özelliği bizim bu tez çalışmamızda, kimyasalı gavaj yöntemiyle uyguladığımız için çok büyük avantaj sağladı. Sıçanlar omnivor hayvanlardır. Bu nedenle laboratuvar yemi yapımında hem bitkisel hem de hayvansal kökenli yem maddeleri kullanılmaktadır. Genellikle 2-3 yıl yaşarlar ancak daha düşük kalorili besinlerle beslenen sıçanların daha uzun süre yaşadıkları bildirilmektedir [98,106].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada Luna Experience SC 400 Fungusit'inin genotoksik etkisinin ve oksidatif hasar potansiyelinin olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Mersin Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda 12 aylık ve ortalama 400 gr ağırlığındaki dişi sıçanlara 30 gün süresince 48 saatlik aralıklarla, gavaj yoluyla, hazırlanan doz grupları uygulanmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

➤ Homojenizasyon Tamponu

0,89 gr EDTA (Sigma) ve 0,438 gr NaCl (Merck) %10'luk DMSO çözeltisi içinde (10 ml DMSO ve 90 ml distile su) çözülerek hazırlanmıştır.

➤ Lizis çözeltisi - (500 mL - pH 10)

75,05 gr NaCl (Merck), 18,6 gr EDTA, 0,6 gr Trizma (Tris) (Sigma) üzerine 350 mL saf su ilave edildi. 20 dk sonra 4 gr NaOH (Merck) eklenerek saf su ile 445 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu solüsyondan 71 mL alındı, üzerine 8 mL DMSO (Carlo Erba) ve 1 mL Triton-X-100 (Sigma) eklenerek hazırlandı.

➤ Fosfat tamponu (PBS)

0,96 gr PBS (Sigma) 100 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

➤ Düşük erime noktalı agaroz (LMA)

0,065 gr LMA (Bioshop) 10 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

➤ Yüksek erime noktalı agaroz (NMA)

0,25 gr NMA (Sigma) 50 mL PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. NMA, lamaları kaplamak için kullanılmıştır.

➤ Elektroforez çözeltisi – (1,5 lt –pH 13)

18 gr NaOH (300 mM NaOH), 0,63 gr EDTA (1 mM EDTA) üzerine 1,5 lt olana kadar saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

➤ Nötralizasyon çözeltisi – (500 mL – pH 7,5)

24 gr Trisma base (Sigma) 500 mL'ye kadar saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

➤ Etidyum Bromür Boya solüsyonu

5 mg etidyum bromüre 50 mL saf su ilave edilerek stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 1:4 oranında seyreltilerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

➤ Akridin Oranj Boya solüsyonu

0,01 gr akridin oranj, 100 ml distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

➤ Fosfat Tamponu

0,681 gr KH_2PO_4 distile suda çözünerek 100 ml'ye tamamlandı. 2,77 gr $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözünerek 155 ml'ye tamamlandı. İki çözelti karıştırılarak pH:7'ye ayarlandı.

➤ Hidrojen Peroksit

%30'luk stok H_2O_2 'den 34 μl alınarak fosfat tamponuyla 10 ml'ye tamamlandı.

➤ TCA Çözeltisi(%10)

10 gr TCA (Trikloro Asetik Asit, Merck), 100 ml distile su içinde çözüldü.

➤ TBA Çözeltisi (%0,0675)

0,3375 gr TBA (Tiyobarbitürik Asit, Merck) 50 ml distile su içinde çözüldü.

3.1.2. Dokuların Hazırlanması

Maruziyet süresinin sonunda ketamin ve xylazine karışımı (90 mg/kg Alfamine ve 7 mg/kg Xylazinbio) ile uyutulan sıçanlardan heparinli enjektörlere kanlar alındı, ardından

karaciğer dokuları çıkarılarak tüplere alındı. Dokuların çıkarılmasının ardından tüpler +4 derecede 1 saat bekletilerek ardından analiz işlemleri yapıldı.

3.1.2.1. Kan Hemolizatlarının Hazırlanması

MDA ve CAT ölçümlerinde kullanılacak olan kan hemolizatlarının hazırlanması;

- Stok kanlardan 2 ml kan örnekleri tüplere alınarak +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Kan plazması tüpler üzerinden alındı, şekilli elemanlar üzerine kalan hacmin 3 katı kadar SF (Serum Fizyolojik) eklendi. (% 0,9'luk Tuz Çözeltisi)
- +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı, pellet üzerine 1:3 oranında SF eklendi.
- +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı, pellet üzerine 1:4 oranında soğutulmuş distile su eklendi.
- Tüpler vortekslendi.
- 20-30 dakika kadar +4°C'de bekletildi.
- +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Pellet atıldı.
- Supernatant, testlerde kullanılmak üzere alındı.

3.1.2.2. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

- Sıçanlardan elde edilen karaciğerlerden 1 gr örnek alınarak üzerine 10 ml homojenizasyon tamponu eklendi.
- +4°C'de 16.000 rpm'de 3 dakika boyunca homojenize edildi.
- +4°C'de 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı.
- Pellet 1:1 oranında PBS ile karıştırıldı.
- Homojenat, testler uygulanana kadar +4°C'de saklandı.

3.1.3. Grupların Belirlenmesi

Çalışmada 5 grup kullanılmıştır. Bunlar, NK (Negatif Kontrol) , PK (Pozitif Kontrol), 5 mg/kg Luna Grubu, 10 mg/kg Luna Grubu, 20 mg/kg Luna Grubudur.

NK gruplarına gavajla SF verilmiştir.

Luna Gruplarında, stok Luna Experience SC 400 Fungusit'inden hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. Dozlar, LD₅₀ değerine göre belirlenmiştir [48].

PK olarak kullanılan Mitomycin-C (MMC) stok çözeltiden 2 mg/kg olacak şekilde hazırlanarak pozitif kontrol gruplarına uygulanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Santrifüj (Nüve-NF 815)

pH metre (Inolab wtw)

Spektrofotometre (Analytik Jena, Specord 210 Plus)

Elektroforez (Thermo Scientific, EC300XL2)

Floresan mikroskop (Olympus, BX51 mikroskop)

Sıcak su banyosu (Nahita, 601/12)

Manyetik karıştırıcı (Misung Scientific, MS300HS)

Hassas terazi (Kern, ALJ 220-4)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan Hemolizatlarına Komet Yönteminin Uygulanması

- Tam kan PBS ile 1:10 oranında seyreltildi.
- 250 µl LMA + 30 µl örnek karıştırıldı.
- Karışımlar, önceden NMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı.
- Lamlar, 15 dakika +4°C'de bekletildi.
- Lameller, lamların üzerinden alındı ve şalelere konuldu, üzerine 80 ml lizis çözeltisi eklendi ve 1 saat +4°C'de bekletildi.
- Lizisten çıkarılan preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi
- Elektroforez çözeltisiyle tank dolduruldu ve 20 dakika çalıştırılmadan bekletildi.
- 20 dakika 25V (Volt) 300 mA'de (miliamper) elektroforez edildi.
- Elektroforezden çıkarılan preparatlar 15 dakika nötralizasyon çözeltisinde bekletildi.
- Nötralizasyondan çıkarılan preparatlar 10 dakika soğuk etanolde bekletildi.
- Etanolden çıkarılan preparatlar kurutma kağıdı üzerine yayıldı.

- Preparatlar 75 µl etidyum bromür ile boyanarak florasan mikroskopta incelendi.

3.2.2. Kan Hemolizatlarına MN Yönteminin Uygulanması

- Tam kandan 1 damla alınarak lama damlatıldı.
- Lamel yardımıyla kan, lam üzerine yayıldı.
- Kuruması için 1 saat bekletildi.
- Kuruduktan sonra 10 dakika etanolde bekletildi.
- 75 µl Akridin Oranj ile boyanarak florasan mikroskopta incelendi.

3.2.3. Karaciğer Homojenatlarına Komet Yönteminin Uygulanması

- Karaciğer homojenatından örnek alınarak PBS ile 1:10 oranında seyreltildi.
- 250 µl LMA + 30 µl örnek karıştırıldı.
- Karışımlar, önceden NMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı.
- Lamlar, 15 dakika +4°C'de bekletildi.
- Lameller, lamların üzerinden alındı ve şalelere konuldu, üzerine 80 ml lizis çözeltisi eklendi ve 1 saat +4°C'de bekletildi.
- Lizisten çıkarılan preparatlar elektroforez tankına yerleştirildi
- Elektroforez çözeltisiyle tank dolduruldu ve 20 dakika çalıştırılmadan bekletildi.
- 20 dakika 25V 300 mA'de elektroforez edildi.
- Elektroforezden çıkarılan preparatlar 15 dakika nötralizasyon çözeltisinde bekletildi.
- Nötralizasyondan çıkarılan preparatlar 10 dakika soğuk etanolde bekletildi.
- Etanolden çıkarılan preparatlar kurutma kağıdı üzerine yayıldı.
- Preparatlar etidyum bromür ile boyanarak florasan mikroskopta incelendi.

3.2.4. Karaciğer Homojenatlarına MN Yönteminin Uygulanması

- Karaciğer homojenatı PBS ile 1:10 oranında seyreltildi.
- Seyreltik solüsyondan 100 µl alındı, lamel yardımı ile lam üzerine yayıldı.
- Kuruması için 1 saat bekletildi.
- Kuruduktan sonra 10 dakika etanolde bekletildi.
- 75 µl Akridin Oranj ile boyanarak florasan mikroskopta incelendi.

3.2.5. Kan ve Karaciğer Dokularında Katalaz Enzim Düzeyinin Ölçülmesi

Katalaz enzim düzeyinin ölçülmesi Aebi'nin yöntemine göre, 240 nm'de hidrojen peroksit'in azalması göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır[107,108].

Örnekler, spektrofotometre küvetlerine Tablo 3.1'deki oranlarla hazırlanmış ve 240 nm'de incelenmiştir.

➤ H₂O₂, spektrofotometre küvetine en son eklenir ve küvet vortekslenir.

Tablo 3.1. Katalaz Ölçümü Hazırlık Tablosu [107]

	Kör	Numune
H₂O₂	10 µl	10 µl
Fosfat Tamponu	2990 µl	2990 µl
Örnek	-	10 µl
Distile Su	10 µl	-

3.2.6. Kan ve Karaciğer Dokularında Malondialdehit Düzeyinin Ölçülmesi

Ohkawa'nın methoduna göre spektrofotometrede 532 nm'de okunarak ortamda bulunan malondialdehit miktarının belirlenmesi esasına göre ölçülmüştür[108,109].

Örnekler, spektrofotometre küvetlerine Tablo 3.2'deki oranlarla hazırlanmış ve 532 nm'de incelenmiştir.

Tablo 3.2. MDA Ölçümü Hazırlık Tablosu[109]

	Kör	Numune
TCA	2,5 ml	2,5 ml
Örnek	-	0,5 ml
Distile Su	0,5 ml	-
TBA	1 ml	1 ml

- TBA eklemeyen önce tüpler 95°C'de su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
- TBA eklendikten sonra tüpler 95°C'de su banyosunda 60 dakika inkübe edildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Deney protokolleri sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde STATA MP/11 paket programı içerisinde Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, ANOVA, Kruskal Wallis, Pearson Korelasyon ve Spearman Korelasyon metodları kullanılmıştır. Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını incelemek amacıyla uygulanan dozlar hem kendi aralarında hem pozitif kontrol değerleri hem de negatif kontrol değerleri ile kıyaslanmıştır. Tüm analizler yapılırken 35 sıçandan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Değerlendirmeler yapılırken, p değeri (güven aralığı) 0,05 ve 0,001 olarak alınmıştır.



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmada, belirlenen doz gruplarına maruz bırakılmış sıçanlardan alınan kan ve karaciğer dokularında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen oksidatif DNA hasar verileri komet test yöntemi ile belirlenmiştir. Komet deneyi sonucunda hazırlanan preparatlar etidyum bromür ile boyanmıştır. Her bir sıçana ait bir dozdan 100 hücre sayılmış ve sayılan hücreler uğramış oldukları hasara göre tip 0, tip 1, tip 2 tip 3 ve tip 4 olmak üzere beş grupta sınıflandırılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi aşağıdaki formüller kullanılarak belirlenmiştir [110].

Genetik hasar indeksi (GHI) : [(Tip0x0) + (Tip1x1) + (2xTip2) + (3xTip3) + (4xTip4)]

Hasarlı hücre yüzdesi (HHY) : (Tip2) + (Tip3) + (Tip4)

Genotoksisite test sonuçları kan ve karaciğer hücrelerinde mikronukleus test yöntemi ile belirlenmiştir. Hazırlanan preparatlar akridin oranj ile boyanmış kan hücreleri için 2000 hücre, karaciğer hücreleri için 1000 hücre sayılmıştır.

Oksidatif hasar potansiyeli kan ve karaciğer hücrelerinde CAT ve MDA düzeyleri ölçülerek belirlenmiştir. Deney sonuçları uygun absorbans değerleri kullanılarak (CAT: 240 nm, MDA: 532 nm) hesaplanmıştır. CAT sonuçları alınırken ilk ölçüm ve 30. Saniye ölçümleri dikkate alınmıştır.

4.1.1.Kan Hücrelerinde Uygulanan Komet Testi Sonucu Elde Edilen Değerler

Uygulanan dozlar sonucunda sıçanlardan elde edilen komet sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntüler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Komet testi sonucu elde edilen hasarlı kan hücreleri değerleri.

Gruplar	Sıçanlar	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4
NK	1	80	18	1	1	0
	2	79	20	1	0	0
	3	77	22	1	0	0
	4	66	34	0	0	0
	5	69	30	1	0	0
	6	54	44	2	0	0
	7	62	37	1	0	0
5 mg/kg	1	42	52	6	0	0
	2	33	60	5	2	0
	3	43	47	9	1	0
	4	60	36	1	3	0
	5	26	63	11	0	0
	6	48	40	11	1	0
	7	41	53	6	0	0
10 mg/kg	1	12	64	20	4	0
	2	28	69	18	2	0
	3	26	60	13	1	0
	4	30	45	23	2	0
	5	3	57	31	9	0
	6	20	67	9	4	0
	7	7	83	9	1	0
20 mg/kg	1	18	63	21	4	4
	2	22	60	13	1	4
	3	5	66	19	8	2
	4	19	53	20	6	2
	5	24	63	8	3	2
	6	29	55	13	1	2
	7	17	67	13	1	2
PK	1	0	2	12	28	58
	2	0	3	8	22	61
	3	0	2	8	28	62
	4	0	3	12	25	60
	5	0	1	10	24	65
	6	0	2	12	23	63
	7	0	2	12	23	63

NK: Negatif Kontrol PK: Pozitif Kontrol (2 mg/kg MMC)

4.1.2. Kan Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi Sonuçları

Tablo 4.1.'de belirtilen verilerden elde edilen HHY değerleri Tablo 4.2'de, bu değerlerden elde edilen istatistik sonuçları Tablo 4.3'de ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Genel olarak Luna'nın doz artışına bağlı olarak HHY artış göstermiştir. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

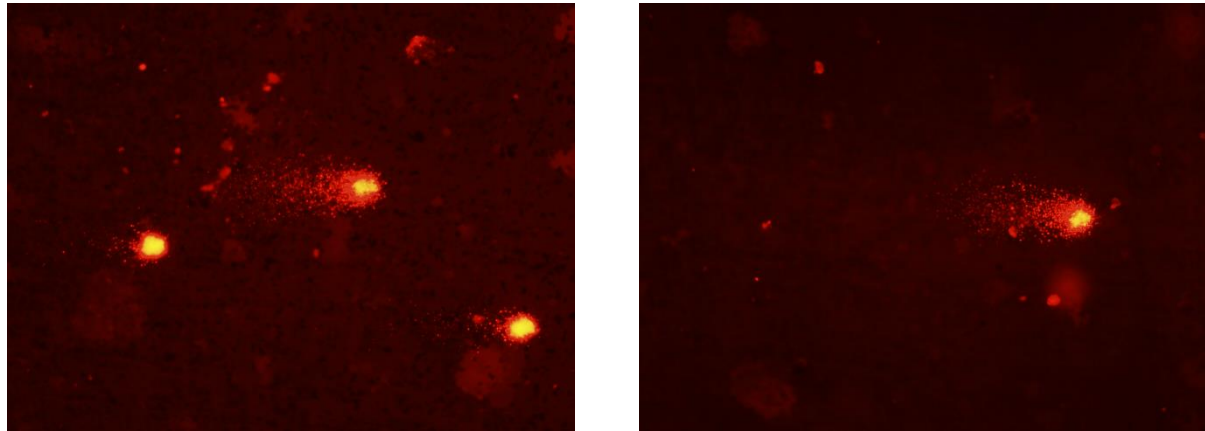
Tablo 4.2. Hasarlı kan hücreleri verilerinden elde edilen HHY değerleri.

Sıçanlar	NK	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	PK
1.Sıçan	2	6	24	29	98
2.Sıçan	1	7	20	18	91
3.Sıçan	1	10	14	29	98
4.Sıçan	0	4	25	28	97
5.Sıçan	1	11	40	13	99
6.Sıçan	2	12	13	16	98
7.Sıçan	1	6	10	16	98

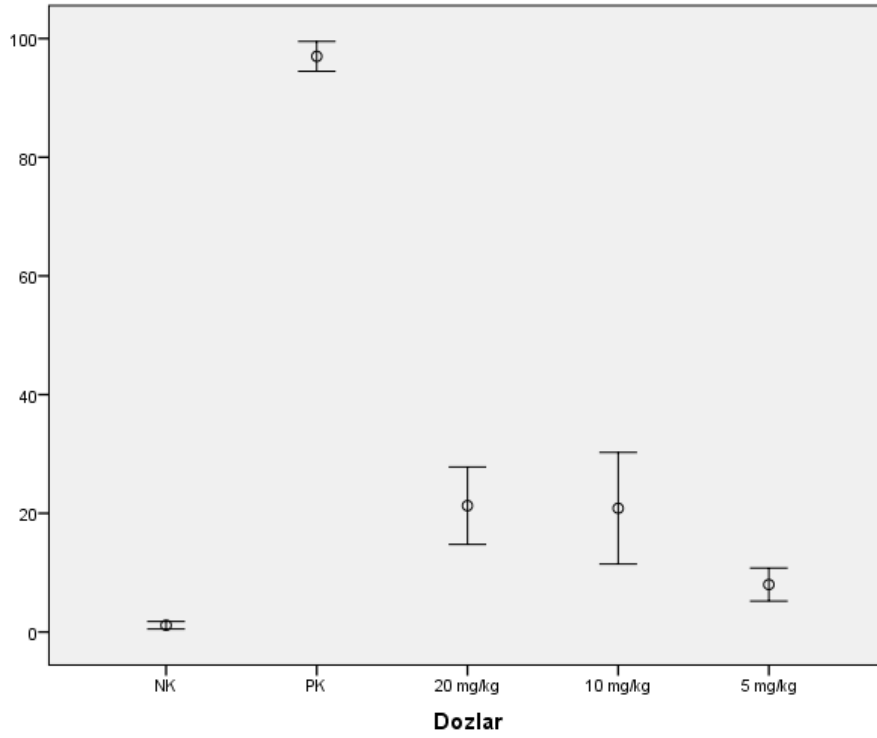
Tablo 4.3. HHY değerlerinin ortalaması ve standart sapması

Gruplar	HHY Sonuçları
NK	01,14 ± 0,69
5 mg/kg	08,00 ± 3,00 ^b
10 mg/kg	20,86 ± 10,17 ^a
20 mg/kg	21,29 ± 7,06 ^a
PK	97,00 ± 2,71 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$)



Şekil 4.1. Kan dokusundan elde edilmiş komet görüntüleri



Şekil.4.2. Kan HHY değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.3. Kan Hücrelerinde Genetik Hasar İndeksi Sonuçları

Tablo 4.1’de belirtilen verilerden elde edilen GHI değerleri Tablo 4.4’de, bu değerlerden elde edilen istatistik sonuçları Tablo 4.5’de ve Şekil 4.3’de verilmiştir Genel olarak Luna’nın doz artışına bağlı olarak GHI artış göstermiştir. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

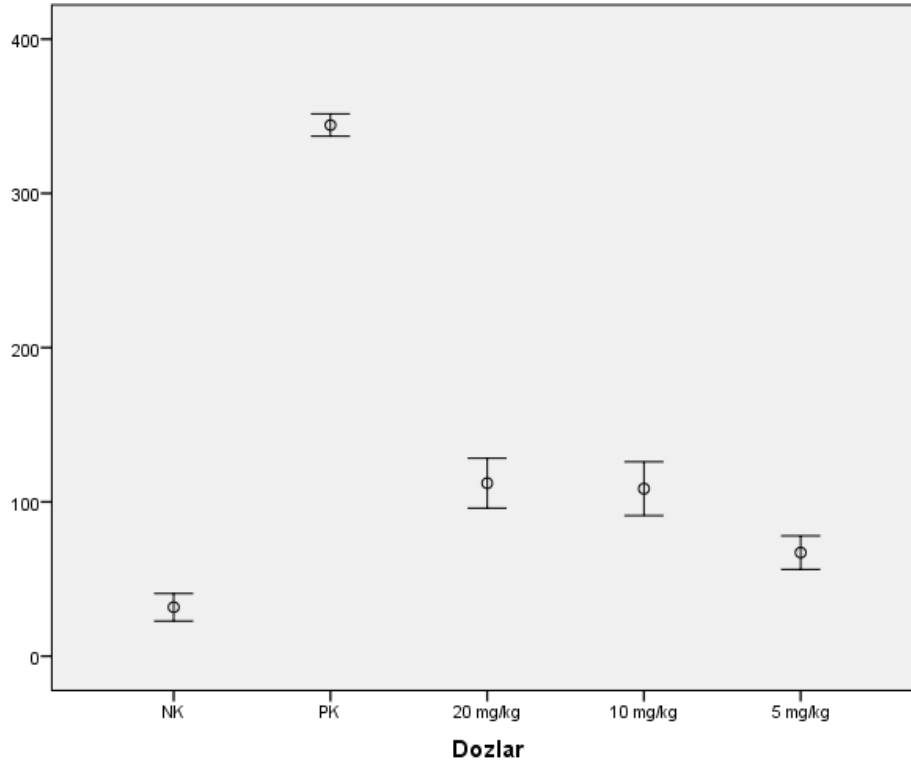
Tablo 4.4. Hasarlı kan hücreleri verilerinden elde edilen GHI değerleri.

Sıçanlar	NK	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	PK
1.Sıçan	23	64	116	133	342
2.Sıçan	22	76	111	105	329
3.Sıçan	24	68	89	136	350
4.Sıçan	34	47	97	119	342
5.Sıçan	32	85	146	96	353
6.Sıçan	48	65	97	92	347
7.Sıçan	39	65	104	104	347

Tablo 4.5. GHI değerlerinin ortalaması ve standart sapması

Gruplar	GHI Sonuçları
NK	31,71±9,60
5 mg/kg	67,14±11,71 ^{ab}
10 mg/kg	108,57±18,86 ^a
20 mg/kg	112,14±17,49 ^a
PK	344,29±7,83 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$)

**Şekil 4.3.** Kan GHI değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.4. Kan Hücrelerinde MN Testi Analiz Sonuçları

Kan hücrelerinde yapılan MN testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.6.'da gösterilmiştir. Luna'nın doz artışına bağlı olarak MN değerlerinde artış, PCE değerlerinde azalma görülmüştür. Tüm dozlar negatif kontrole göre farklılık göstermiştir. En düşük doz grubu (5 mg/kg) ile en büyük doz grubu (20 mg/kg) arasında da anlamlı farklılık görülmüştür. (Tablo 4.7. ve Şekil 4.4. 4.5 ve 4.6)

Tablo 4.6. Kan hücreleri MN testi sonucu elde edilen MN ve PCE değerleri.

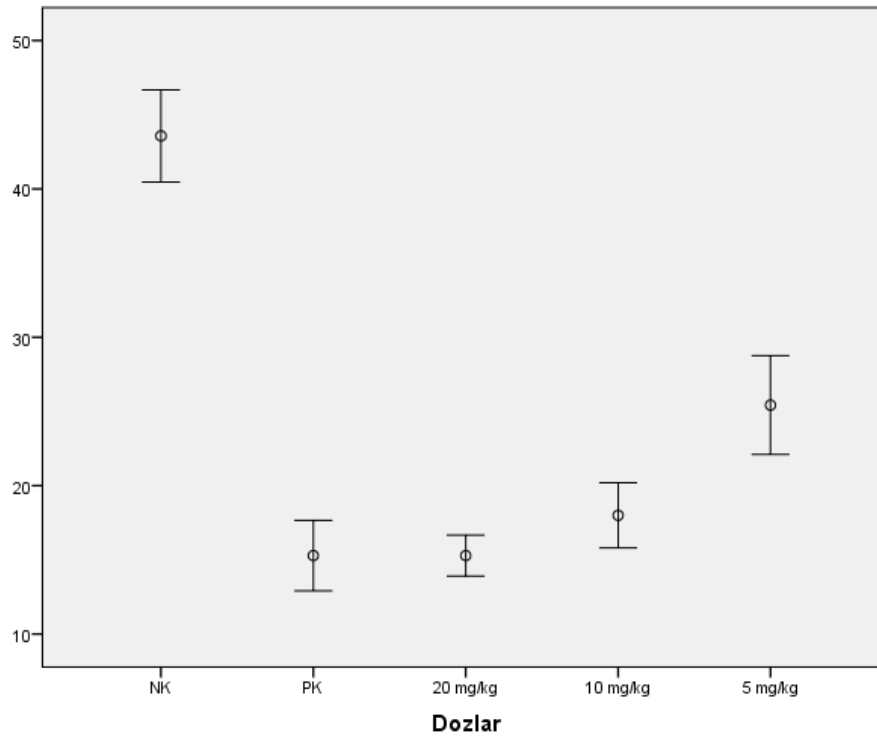
Gruplar	Sıçanlar	MN	PCE
NK	1	3	45
	2	4	43
	3	2	37
	4	3	47
	5	3	45
	6	4	46
	7	3	42
5 mg/kg	1	8	17
	2	9	15
	3	9	16
	4	8	17
	5	9	15
	6	9	14
	7	9	13
10 mg/kg	1	8	18
	2	9	20
	3	11	17
	4	10	16
	5	9	15
	6	9	22
	7	8	18
20 mg/kg	1	6	25
	2	6	32
	3	7	23
	4	7	24
	5	6	25
	6	5	28
	7	6	21
PK	1	22	16
	2	20	12
	3	21	15
	4	19	19
	5	15	16
	6	18	17
	7	21	12

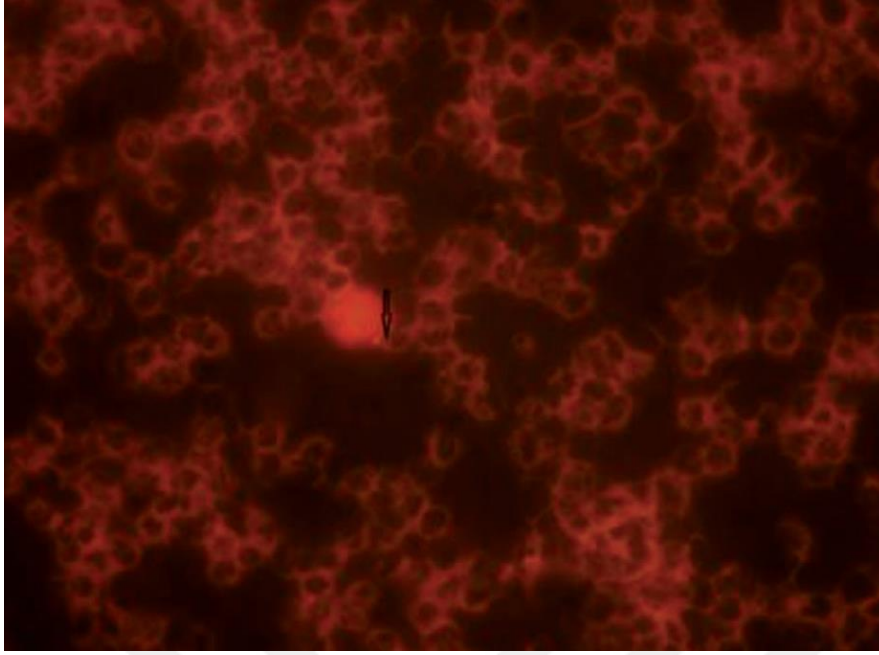
NK: Negatif Kontrol PK: Pozitif Kontrol (2 mg/kg MMC)

Tablo 4.7. MN ve PCE değerlerinin ortalama ve standart sapması

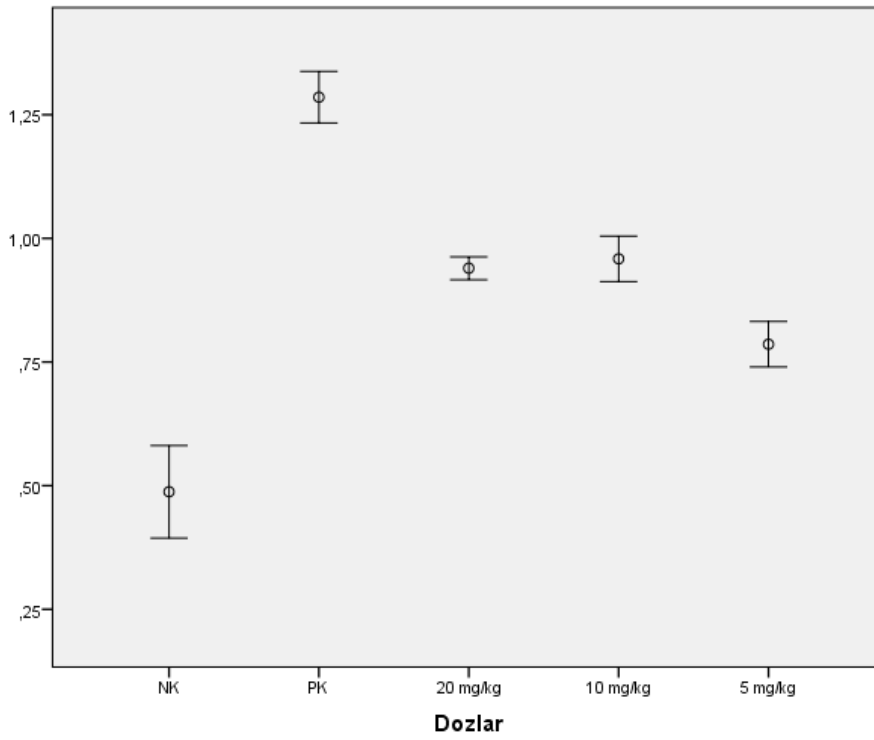
Gruplar	PCE/Total Eritrosit	MN
NK	43,57±3,36	0,49±0,10
5 mg/kg	25,43±3,60 ^{ab}	0,79±0,05 ^{ab}
10 mg/kg	18,00±2,38 ^a	0,96±0,05 ^a
20 mg/kg	15,29±1,50 ^a	0,94±0,02 ^a
PK	15,29±2,56 ^a	1,29±0,06 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$)

**Şekil 4.4.** PCE/Total Eritrosit istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.



Şekil 4.5. Kan dokusundan elde edilmiş MN görüntüsü



Şekil 4.6. Kan MN istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

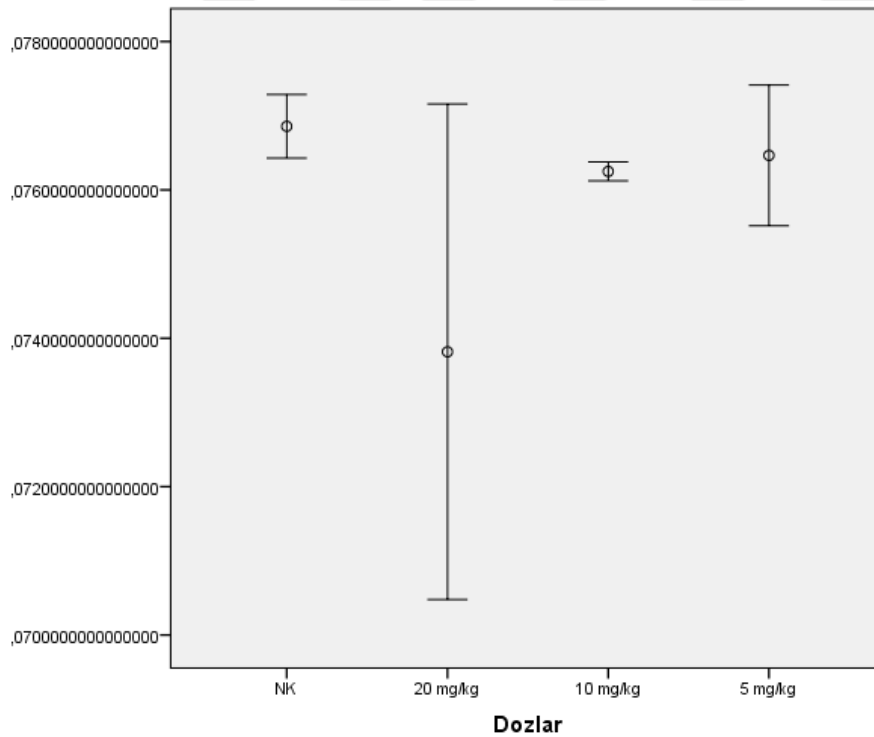
4.1.5. Kan Hücrelerinde Katalaz Ölçüm Testi Analiz Sonuçları

Kan hücrelerinde yapılan katalaz ölçümü testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.8.'de gösterilmiştir. Dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. En yüksek doz grubu (20 mg/kg) ile NK arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0,05$). (Şekil 4.7)

Tablo 4.8. Kan hücreleri katalaz değerlerinin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	CAT Sonuçları
NK	0,077±0,000
5 mg/kg	0,076±0,001
10 mg/kg	0,076±0,000
20 mg/kg	0,074±0,004 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,05$)



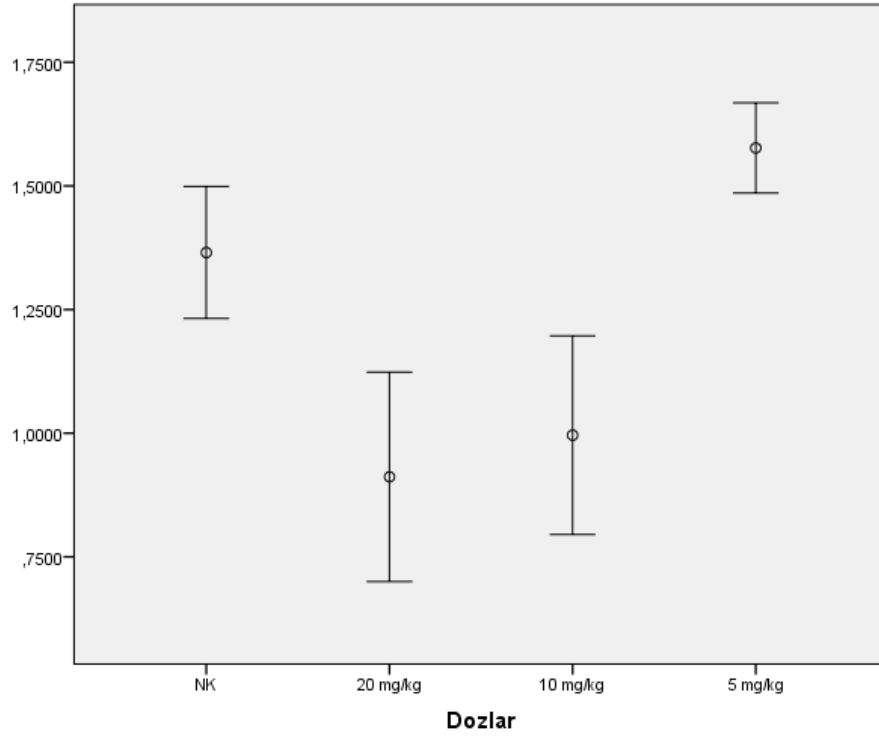
Şekil 4.7. Kan Katalaz istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.6. Kan Hücrelerinde Malondialdehit Ölçüm Testi Analiz Sonuçları

Kan hücrelerinde yapılan MDA ölçümü testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Şekil 4.8.)

Tablo 4.9. Kan hücreleri MDA değerlerinin ortalaması ve standart sapması

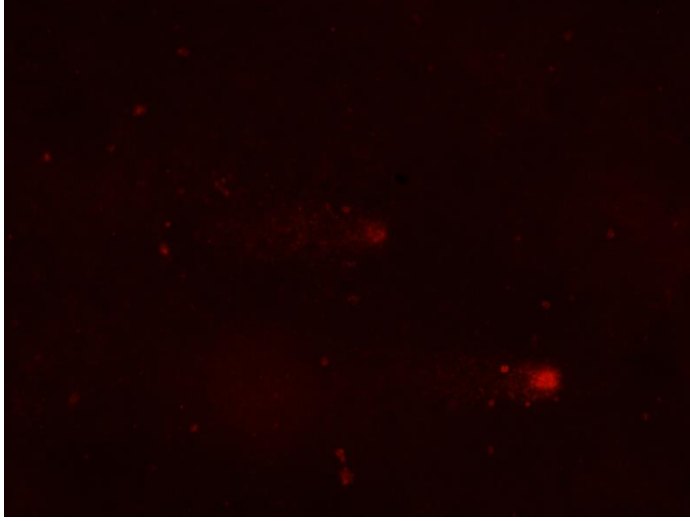
Gruplar	MDA Sonuçları
NK	1,37±0,14
5 mg/kg	1,58±0,10
10 mg/kg	1,00±0,22
20 mg/kg	0,91±0,23



Şekil 4.8. Kan MDA istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.7. Karaciğer Hücrelerinde Uygulanan Komet Testi Sonucu Elde Edilen Değerler

Uygulanan dozlar sonucunda sıçanlardan elde edilen komet sonuçları Tablo 4.10.'da gösterilmiştir. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntü Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Karaciğer dokusundan elde edilmiş komet görüntüleri

Tablo 4.10. Komet testi sonucu elde edilen hasarlı karaciğer hücreleri değerleri

Gruplar	Sıçanlar	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4
NK	1	65	28	6	1	0
	2	66	26	6	2	0
	3	67	26	6	1	0
	4	68	23	8	1	0
	5	67	24	8	1	0
	6	69	25	5	1	0
	7	65	25	8	2	0
5 mg/kg	1	56	22	12	5	5
	2	57	18	14	7	4
	3	60	17	12	6	5
	4	63	16	9	8	4
	5	53	23	15	5	4
	6	56	21	13	7	3
	7	59	24	8	6	3
10 mg/kg	1	16	38	15	22	9
	2	20	45	16	11	8
	3	22	43	15	12	8
	4	21	47	17	11	4
	5	17	49	18	8	8
	6	19	43	17	14	7
	7	23	41	16	12	8
20 mg/kg	1	0	9	12	26	53
	2	0	8	11	25	56
	3	1	9	14	26	50
	4	0	10	13	24	53
	5	2	11	14	27	46
	6	0	8	16	23	53
	7	1	9	15	24	51
PK	1	0	2	6	28	64
	2	0	3	5	27	65
	3	0	1	6	27	66
	4	0	2	7	25	66
	5	0	1	8	24	67
	6	0	1	5	25	69
	7	0	2	8	25	65

NK: Negatif Kontrol PK: Pozitif Kontrol (2 mg/kg MMC)

4.1.8. Karaciğer Hücrelerinde Hasarlı Hücre Yüzdesi Sonuçları

Tablo 4.10'de belirtilen verilerden elde edilen HHY değerleri Tablo 4.11.'de bu değerlerden elde edilen istatistik sonuçları da Tablo 4.12 ve Şekil 4.10.'de verilmiştir. Genel olarak Luna'nın doz artışına bağlı olarak HHY artış göstermiştir. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

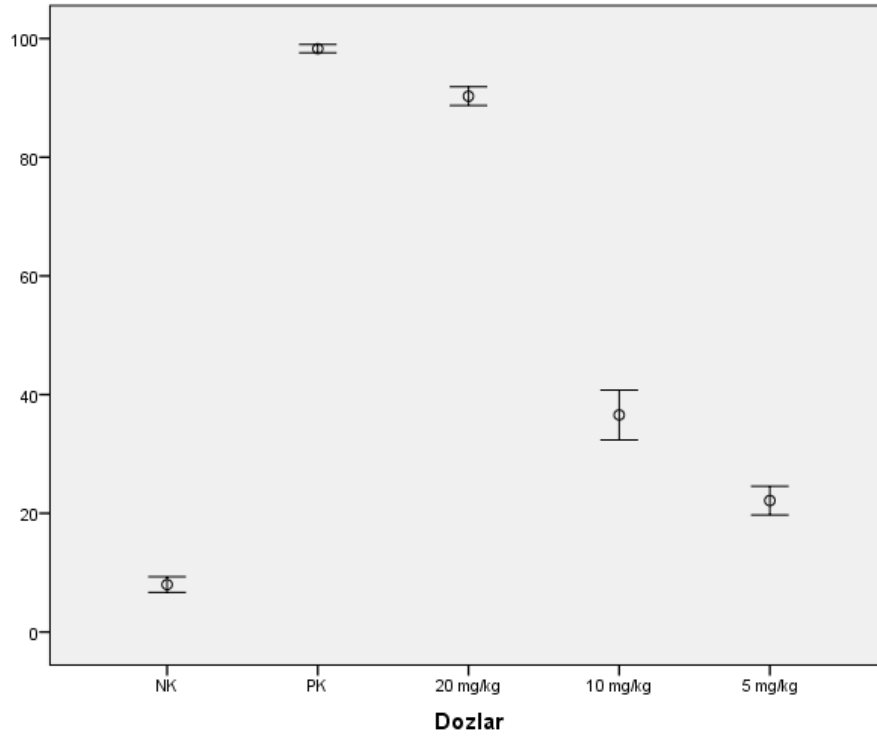
Tablo 4.11. Hasarlı karaciğer hücreleri verilerinden elde edilen HHY değerleri.

Sıçanlar	NK	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	PK
1.Sıçan	7	22	46	91	98
2.Sıçan	8	25	35	92	97
3.Sıçan	7	23	35	90	99
4.Sıçan	9	21	32	90	98
5.Sıçan	9	24	34	87	99
6.Sıçan	6	23	38	92	99
7.Sıçan	10	17	36	90	98

Tablo 4.12. HHY değerlerin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	HHY Sonuçları
NK	08,00±1.41
5 mg/kg	22,14±2,61 ^{ab}
10 mg/kg	36,57±4,54 ^{ab}
20 mg/kg	90,28±1,70 ^a
PK	98,28±0,75 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$)



Şekil 4.10. Karaciğer HHY Değerleri İstatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.9. Karaciğer Hücrelerinde Genetik Hasar İndeksi Sonuçları

Tablo 4.10'de belirtilen verilerden elde edilen GHI değerleri Tablo 4.13'de, bu değerlerden elde edilen istatistik sonuçları da Tablo 4.14. ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Genel olarak Luna'nın doz artışına bağlı olarak GHI artış göstermiştir. Değerler bakımından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

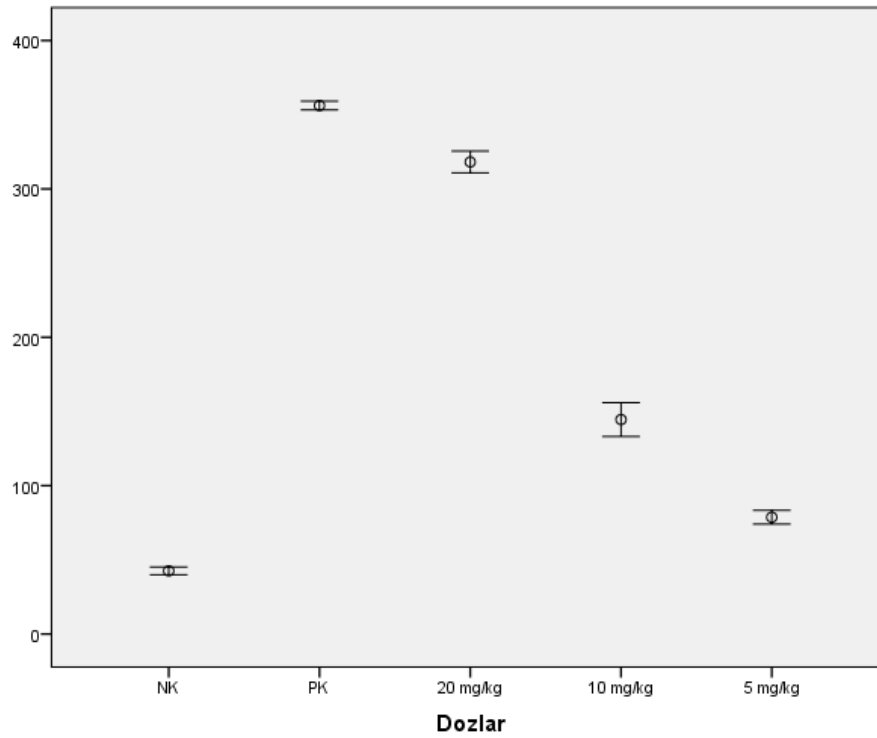
Tablo 4.13. Hasarlı karaciğer hücreleri verilerinden elde edilen GHI değerleri.

Sıçanlar	NK	5 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	PK
1.Sıçan	43	81	170	323	354
2.Sıçan	44	83	142	329	354
3.Sıçan	41	79	141	315	358
4.Sıçan	42	74	130	320	355
5.Sıçan	43	84	141	304	357
6.Sıçan	38	80	147	321	362
7.Sıçan	47	70	141	315	353

Tablo 4.14. GHI değerlerinin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	GHI Sonuçları
NK	42,57±2,76
5 mg/kg	78,71±5,02 ^{ab}
10 mg/kg	144,57±12,31 ^{ab}
20 mg/kg	318,14±7,88 ^a
PK	356,14±3,13 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$)

**Şekil 4.11.** Karaciğer GHI Değerleri İstatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı

4.1.10. Karaciğer Hücrelerinde MN Testi Analiz Sonuçları

Karaciğer hücrelerinde yapılan MN testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.15.'te gösterilmiştir. Luna'nın doz artışına bağlı olarak MN değerleri artış göstermiştir. Tüm gruplar arasında anlamlı farklılık görülmüştür. (Tablo 4.16, Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.)

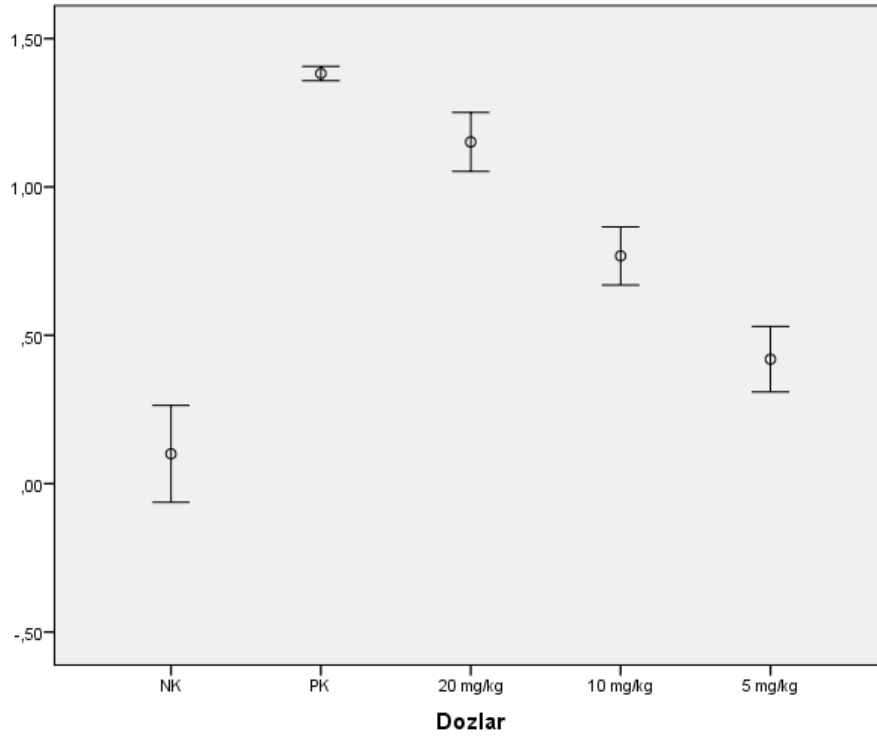
Tablo 4.15. Karaciğer hücreleri MN testi sonucu elde edilen MN değerleri.

Dozlar	Sıçanlar	MN
NK	1	1
	2	2
	3	1
	4	1
	5	2
	6	1
	7	0
5 mg/kg	1	3
	2	3
	3	3
	4	2
	5	4
	6	2
	7	2
10 mg/kg	1	7
	2	7
	3	5
	4	4
	5	8
	6	5
	7	6
20 mg/kg	1	13
	2	19
	3	14
	4	21
	5	11
	6	12
	7	12
PK	1	22
	2	26
	3	24
	4	23
	5	24
	6	26
	7	24

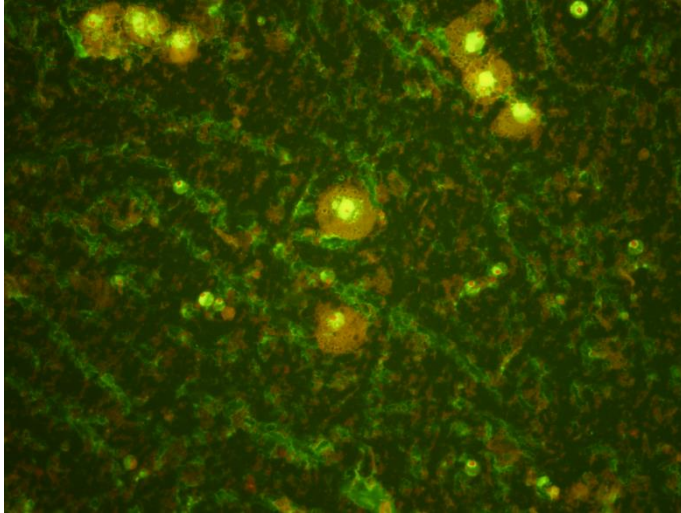
Tablo 4.16. MN değerlerinin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	MN Sonuçları
NK	0,10±0,16
5 mg/kg	0,42±0,12 ^{ab}
10 mg/kg	0,77±0,11 ^{ab}
20 mg/kg	1,15±0,11 ^a
PK	1,38±0,03 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), ^b 20 mg/kg ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$)



Şekil 4.12. Karaciğer MN değerleri istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.



Şekil 4.13. Karaciğer dokusundan elde edilmiş MN görüntüsü

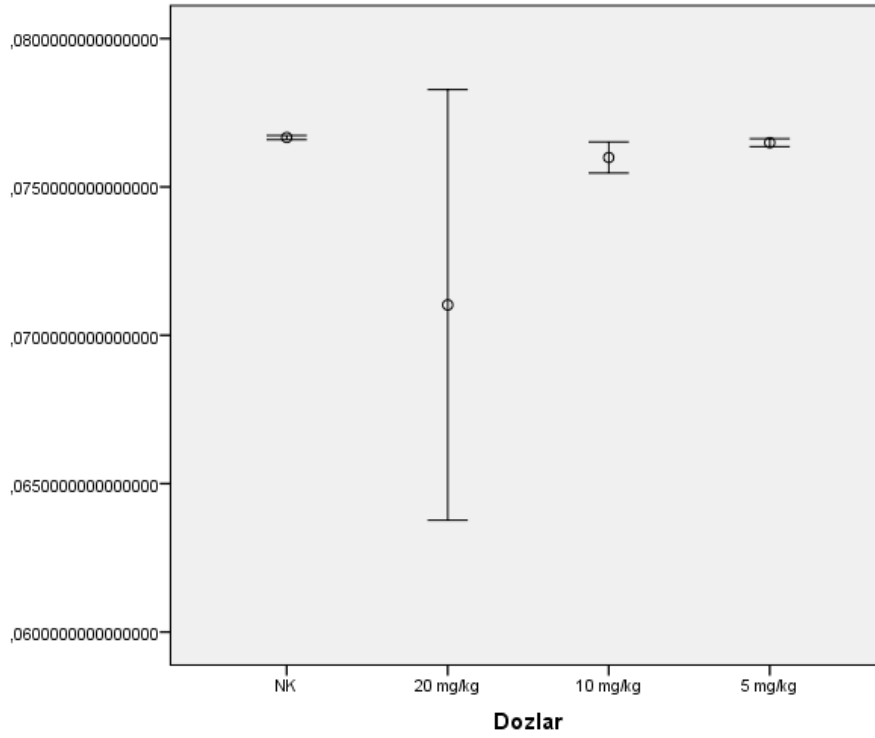
4.1.11. Karaciğer Hücrelerinde Katalaz Ölçüm Testi Analiz Sonuçları

Karaciğer hücrelerinde yapılan katalaz ölçümü testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.17'de gösterilmiştir. Dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. En yüksek doz grubu (20 mg/kg) ile NK arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$). (Şekil 4.14.)

Tablo 4.17. Karaciğer hücreleri katalaz değerlerinin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	Katalaz Sonuçları
NK	0,077±0,000
5 mg/kg	0,076±0,000
10 mg/kg	0,076±0,001
20 mg/kg	0,071±0,008 ^a

^a NK ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$)



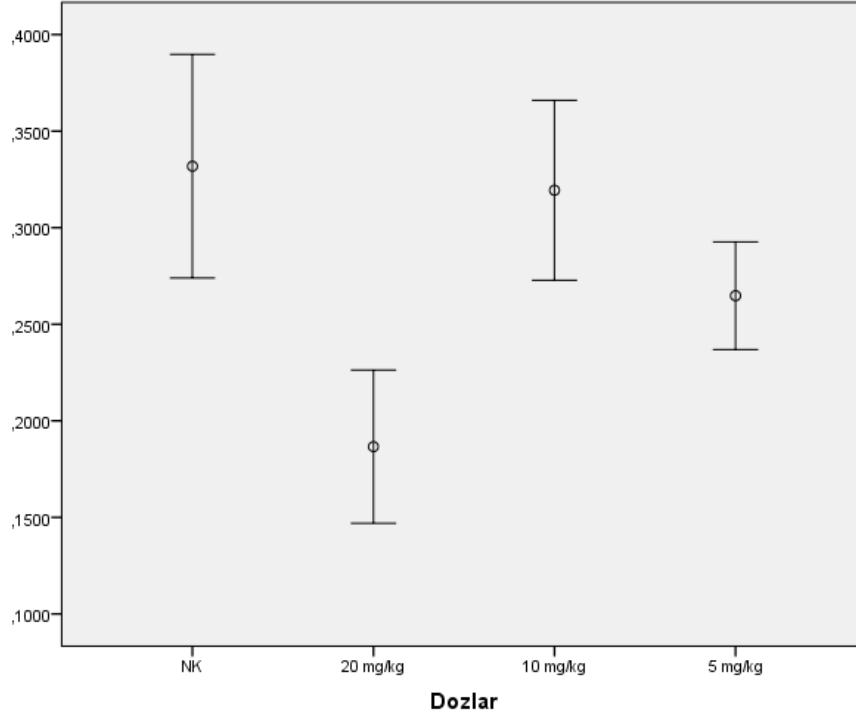
Şekil 4.14. Karaciğer katalaz istatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.12. Karaciğer Hücrelerinde Malondialdehit Ölçüm Testi Analiz Sonuçları

Karaciğer hücrelerinde yapılan MDA ölçümü testi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.18.'de gösterilmiştir. Luna'nın doz artışına bağlı olarak sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Şekil 4.15.) .

Tablo 4.18. Karaciğer hücreleri MDA değerlerinin ortalaması ve standart sapması.

Gruplar	MDA Sonuçları
NK	0,33±0,06
5 mg/kg	0,26±0,03
10 mg/kg	0,32±0,05
20 mg/kg	0,19±0,04



Şekil 4.15. Karaciğer MDA İstatistik sonuçlarının dozlara göre dağılımı.

4.1.13. Korelasyon Değerlendirmesi

Korelasyon değerlendirme tablosu Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.19. Korelasyon Değerlendirme Tablosu

Değer	Korelasyon
>0,80	Çok Yüksek Korelasyon
0,60-0,80	Yüksek Korelasyon
0,40-0,59	Orta Derece Korelasyon
<0,40	Zayıf Korelasyon

Kan dokusunda yapılan komet ve MN testi sonuçları arasında çok yüksek korelasyon olduğu, CAT ve MDA sonuçları arasında orta derece korelasyon olduğu, komet ve MN test sonuçlarıyla CAT ve MDA test sonuçları arasında da negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.20.)

Tablo 4.20. Kan Hücrelerine Uygulanan Test Sonuçları Arasındaki Korelasyon

Değişkenler	Kan GHI	Kan HHY	Kan MDA	Kan CAT	Kan MN
Kan - GHI	1				
Kan - HHY	0,99**	1			
Kan - MDA	-0,66**	-0,63**	1		
Kan - CAT	-0,44*	-0,40*	0,51**	1	
Kan - MN	0,87**	0,84**	-0,48**	-	1

Karaciğer dokusunda yapılan komet ve MN testi sonuçları arasında çok yüksek korelasyon olduğu, CAT ve MDA sonuçları arasında orta derece korelasyon olduğu, komet ve MN test sonuçlarıyla CAT ve MDA test sonuçları arasında da negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.21.)

Tablo 4.21. Karaciğer Hücrelerine Uygulanan Test Sonuçları Arasındaki Korelasyon

Değişkenler	Karaciğer GHI	Karaciğer HHY	Karaciğer MDA	Karaciğer CAT	Karaciğer MN
Karaciğer - GHI	1				
Karaciğer - HHY	0,99**	1			
Karaciğer - MDA	-0,67**	-0,70**	1		
Karaciğer - CAT	-0,53**	-0,52**	0,55**	1	
Karaciğer - MN	0,95**	0,95**	-0,62**	-0,53**	1

Kan ve karaciğer dokularında yapılan komet testi sonuçlarından elde edilen GHI ve HHY değerleri arasında yüksek korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.22.)

Tablo 4.22. Tüm Komet Sonuçları Arasındaki Korelasyon

Değişkenler	Kan GHI	Kan HHY	Karaciğer GHI	Karaciğer HHY
Kan - GHI	1			
Kan - HHY	0,99**	1		
Karaciğer - GHI	0,79**	0,77**	1	
Karaciğer - HHY	0,78**	0,75**	0,99**	1

Kan ve karaciğer dokularında yapılan MN testi sonuçları arasında çok yüksek korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.23.)

Tablo 4.23. Tüm MN Sonuçları Arasındaki Korelasyon

Değişkenler	Kan MN	Karaciğer MN
Kan MN	1	
Karaciğer MN	0,88**	1

Kan ve karaciğer dokularında yapılan CAT ve MDA testi sonuçlarına göre dokuların birbirleriyle arasında korelasyon olmadığı tespit edilmiştir. Aynı dokunun CAT ve MDA sonuçları arasında da orta derece korelasyon olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 4.24.)

Tablo 4.24. Oksidatif Stres Test Sonuçları Arasındaki Korelasyon Tablosu

Değişkenler	Kan MDA	Karaciğer MDA	Kan CAT	Karaciğer CAT
Kan MDA	1			
Karaciğer MDA	-	1		
Kan CAT	0,51**	-	1	
Karaciğer CAT	-	0,55**	-	1

4.2. Tartışma

Bu çalışmada ticari bir fungusit olarak satılan Luna Experience SC 400'ün sıçan karaciğer ve kan dokularının genotoksik hasarını ve oksidatif hasar potansiyelini belirlemek üzere testler yapılmıştır. Komet ve MN yöntemi kullanılarak hücrelerde meydana gelen genetik hasar belirlenmiştir. CAT enzim düzeyi ölçülerek oksidatif hasar potansiyeli ve MDA düzeyini ölçerek lipid peroksidasyonu belirlenmiştir.

Luna Experience SC 400 fungusiti, belirlenen dozların artışına bağlı olarak sıçan karaciğer ve kan dokularında istatistiksel açıdan anlamlı genotoksik etki göstermiştir. Komet testi sonucunda elde edilen GHI ve HHY değerleri doz artışına bağlı olarak artmıştır. Uygulanan dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında; 5 mg/kg için $p < 0,001$, 10 mg/kg için $p < 0,001$ ve 20 mg/kg için $p < 0,001$ olarak değerlendirilmiştir.

MN testi sonuçlarından elde edilen verilere göre, Luna Experience SC 400 fungusiti dozların artışına bağlı olarak sıçan karaciğer ve kan dokularında istatistiksel açıdan anlamlı toksik etki göstermiştir. Kan hücreleri için 2000 eritrosit sayılmış ve bunların içinden PCE'lerin

sayısı belirlenmiş, daha sonra 2000 PCE sayılıp bunların içerisinde MN içerenlerin sayısı kaydedilmiştir. Uygulanan dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında; 5 mg/kg için $p<0,001$, 10 mg/kg için $p<0,001$ ve 20 mg/kg için $p<0,001$ olarak değerlendirilmiştir. Karaciğer hücreleri için de 1000 hücre sayılmış ve bunların içinden MN içerenlerin sayısı kaydedilmiştir. Uygulanan dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında; 5 mg/kg için $p<0,001$, 10 mg/kg için $p<0,001$ ve 20 mg/kg için $p<0,001$ olarak değerlendirilmiştir.

Luna Experience SC 400 fungusitinin oksidatif hasar potansiyelini belirlemek amacıyla CAT antioksidan enzim düzeyi ve lipid peroksidasyonunu belirlemek amacıyla MDA düzeyi ölçülmüştür. Elde edilen verilere göre sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Çalışmamızda karaciğer ve kan dokularında yapılan komet ve enzim analizleri genel olarak değerlendirildiğinde, oksidatif hasar potansiyeline ilişkin ölçülen CAT düzeyi NK ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılığın rapor edilmesi, DNA'daki genotoksik hasarın oksidatif strese bağlı olabileceğini düşündürmektedir. 5 mg/kg ve 10 mg/kg doz grupları ile NK arasındaki farkın anlamlı olmaması oksidatif hasarın doz artışına bağlı olabileceğini göstermektedir.

Kan dokudaki MDA ölçümleri genel olarak değerlendirildiğinde 5 mg/kg'lık doz grubunda MDA değerlerinde bir artış gözlenmiş olup diğer doz gruplarında bu artışın gözlenmemesi sıçanların lipid peroksidasyonuna toleranslı oldukları sonucunu doğurmaktadır.

Farklı kimyasal ve farklı organizma tipleri kullanılarak benzer in vivo ve in vitro çalışmalarda da, fungusitlerin genotoksik etkisinin olduğu yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Sivikova ve ark. Tebukonazol bazlı bir fungusitin sığır lenfositlerinde bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla in vitro bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada sığır lenfositleri 3, 6, 15, 30 ve 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dozlarında 24 ve 48 saat süreyle fungusite maruz bırakılmıştır. MN testinin uygulandığı çalışmada, MN frekasında doz artışına bağlı olarak artış kaydedilmiştir ($p<0,05$). Çalışmada elde edilen sonuçlar, tebukonazol bazlı fungusitin sığır lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik hasara sebep olduğunu göstermişlerdir [54]. Bu çalışma ile bizim çalışmamızda kullanılan organizma ve yapılan testler farklı olmasına rağmen, oluşan etki genotoksisite açısından değerlendirildiğinde iki çalışma birbirine paralellik göstermektedir.

Bowen ve ark. Sıçanlarda bazı kimyasalların genotoksik etkisini araştırmak amacıyla komet ve MN testlerini de içeren bir çalışma yapmışlardır. Çalışmanın benzimidazole grubu bir

fungusit olan Carbendazim kullanılan kısmında, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg ve 2000 mg/kg dozları kullanılmıştır. Karaciğer dokusunda yapılan komet testi sonucunda, doz artışına bağlı istatistiksel açıdan anlamlı artış kaydedilmiştir ($p<0,01$). Kan dokuda yapılan komet testi sonucu istatistiksel açıdan anlamlı artış görülmemiştir. Karaciğer ve kan dokusunda yapılan MN testi sonucunda doz artışına bağlı istatistiksel açıdan artış görülmüştür ($p<0,001$) [111]. Bu çalışma ile bizim çalışmamızın yapılan deney düzeneği, çalışılan organizma, yapılan testler ve sonuçlar benzerlik göstermektedir. Sıçanların fungusitlerin oluşturmuş olduğu genotoksik hasara karşı duyarlı oldukları sonucu gösterilmiştir.

Marques ve ark. Mancozan fungusitinin eritrosit nükleer düzensizlikleri ve komet analizinin birbiri ile tamamlayıcı olup olmadıklarını belirlemek amacıyla *Anguilla anguilla* kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada, etken madde olarak bir fungusit olan manzoceb, 0,29 ve 2,9 µg dozlarında 3 gün boyunca yılan balıklarına uygulanmıştır. Her grupta 3 canlı kullanılmış, negatif kontrol olarak da 3 yılan balığı temiz bir akvaryumda bekletilmiştir. Komet testinin uygulandığı bu çalışma sonucunda, GHI değerlerinde doz artışına bağlı istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0,001$). Dozların negatif kontrole göre de artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur [112]. Marques ve ark. Mancozan fungusitinin hem DNA düzeyinde hem de kromozomal düzeyde genetik hasar oluşturabileceğini rapor etmişlerdir. Bu iki tesin birbiri ile tamamlayacağı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da yapmış olduğumuz komet testi DNA düzeyinde, MN testi de kromozomal düzeyde genetik hasarı tespit etmekte kullanıldığından iki çalışma birbirine paralellik göstermektedir.

Sutiakova ve ark. Euparen Multi fungusitinin genotoksik etkilerini test etmek amacıyla koyunlardan alınan lenfosit hücrelerinde bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada lenfositler, 28 gün boyunca 93 mg/kg dozunda fungusite maruz bırakılmıştır. 28 günün sonunda lenfositlere MN testi uygulanmıştır. 1000 adet binükleus hücrenin sayıldığı test sonucunda, deney grubunun MN sayılarının istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde kontrol grubundan fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) [113]. Bu çalışma ile bizim çalışmamızda kullanılan organizmalar farklı olmasına rağmen, MN frekansındaki artışın iki çalışmanın birbirini destekler nitelikte olduğunu göstermektedir.

Schwarzbacherova ve ark. Fungusitlerin genotoksik etkisini test etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Sığır lenfositlerinin kullanıldığı in vitro çalışmada dozlar, 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 3 µg/mL, 6 µg/mL ve 15 µg/mL olarak belirlenmiştir. Komet testinin uygulandığı çalışmada, en yüksek doz hariç diğer dozlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı artış kaydedilmiştir ($p<0,001$). En yüksek doz grubunda hücrelerin %80'inde erken hücre ölümü

rapor edilmiştir [114]. Bizim çalışmamızda, genotoksik etkileri ölçmek amacıyla yapmış olduğumuz komet ve MN testi verileri birbirlerini destekler niteliktedir. Schwarzbacherova ve ark. yapmış olduğu çalışmada Tango Super fungusitinin sığır lenfositlerinde erken hücre ölümünü rapor etmiş olmaları Hao ve ark. tarafından belirtilen ve Colo 320 hücrelerinde yapmış oldukları komet testinin Tip 4 verilerinin apoptozu işaret etmesiyle örtüşmektedir [115]. Bizim çalışmamızda da karaciğer dokusunda komet sonuçlarının tip 4 verileri frekansının yüksek olması, Hao ve ark. öne sürmüş oldukları sonuçlarla birbirini destekler niteliktedir. Schwarzbacherova ve ark.'nın Tango Super fungusitinin meydana getirmiş olduğu genotoksik hasar ve mitokondriyal süperoksit oluşumundaki artışın oksidatif stresin bir sonucu olduğunu belirtmiş olmaları bizim de çalışmamızda karaciğer katalaz analizlerindeki anlamlı artışlarla örtüşmektedir.[115]

Ku-Centurión ve ark. Monceren 250 SC fungusitinin genotoksik etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 2,5 saat süreyle 250 µg/ml, 350 µg/ml, 625 µg/ml, 850 µg/ml and 1250 µg/ml olarak belirlenen dozlarda fungusite maruz bırakılmış zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Yaptıkları komet testinden elde edilen sonuçlara göre, kullanılan fungusitin doz artışına bağlı olarak genotoksisiteyi istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir [116]. Bu çalışmadan ve bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, fungusitlerin farklı canlı gruplarında da benzer etkiler ortaya çıkardığını göstermektedir

Bianchi-Santamaria ve ark. insan lenfosit hücrelerini kullanarak, birkaç kimyasalın genotoksisitesini belirlemek amacıyla MN testi kullandıkları in vitro bir çalışma yapmışlardır. Çalışmanın fungusit (Benomyl) kullanılan aşamasında dozlar, 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sigara kullanmayan 2 kadın ve 2 erkek gönüllüden alınmış lenfositler, 2 saat süreyle kimyasala maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda uygulanan Benomyl fungusitinin doz artışına paralel olarak mikronukleus frekansında artış oluşturduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir [117]. Mikronükleus frekansını arttırması bizim çalışmamızla örtüşür niteliktedir.

Tu ve ark. Japon pirinç balıklarında yaptıkları bir çalışmada, propiconazole fungusitinin oksidatif strese sebep olup olmadığını araştırmışlardır. 2.5 µg/L, 25 µg/L ve 250 µg/L olarak belirledikleri dozlarda değişken sürelerle (3, 7, 14 ve 28 gün) maruz bıraktıkları japon pirinç balıklarından test etmek amacıyla karaciğerleri çıkarmışlardır. Yapılan ölçümler sonucunda CAT aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişme görülmediğini rapor etmişlerdir [118]. Bizim çalışmamızda hem karaciğer hem de kan dokusunda katalaz aktivitesinde doza bağlı olarak artış görülmüştür. Bu açıdan bu iki çalışma paralellik göstermemektedir.

Joshi ve ark. sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, tebukonazol fungusinin erkek sıçanlarda üreme mekanizmasını etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Sıçanlar, 250 mg/kg dozunda ve farklı sürelerde (15, 30 ve 45 gün) tebukonazole maruz bırakılmıştır. Üreme toksisitesi, testislerin ve cinsel organların ağırlık analizleri, doğurganlık, sperm dinamikleri, hormonal analiz ve histopatolojik çalışmalar temel alınmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, testis, epididim, ventral prostat ve seminal vezikülün ağırlığında azalma olduğu, sperm yoğunluğunda ve hareketliliğinde istatistiksel açıdan anlamlı azalma olduğu, tüm gruplarda, testosteron, FSH ve LH hormon düzeylerinde azalma olduğu ve histopatolojik gözlemlerin, tebukonazol maruziyetinden kaynaklanan toksisite oluşumunu desteklediği rapor edilmiştir. Joshi ve ark. bu sonuçların tebukonazolün üreme toksisitesi üzerinde etkisi olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir [119]. Bizim çalışmamızda, kan dokuda yaptığımız total eritrosit içerisindeki PCE oranında azalma gözlenmiş olması, Luna Experience SC 400'ün kan dokuda toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu açıdan değerlendirdiğimizde, Joshi ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki toksisite verileriyle benzerlik göstermektedir.

Ferreira ve ark. oksidatif stresi test etmek amacıyla etken madde olarak tebukonazolün de kullanıldığı bir çalışma yapmışlardır. Güney Amerika kedi balıklarını (*Rhamdia quelen*) kullanarak yaptıkları çalışmada, tebukonazolün dozu 0,88 mg/L olarak belirlemiş ve balıkları 96 saat maruziyete bırakmışlardır. Karaciğer dokusunda yapılan testlerin sonucunda, kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunduğunu rapor etmişlerdir ($p < 0,001$) [63].

Alpertunga ve ark. sıçanlarla yapmış oldukları bir çalışmada, sıçanları bir gün süreyle fungusite (Benomyl+Carbendazim) maruz bırakmışlar. 1 gr/kg + 0,64 gr/kg ve 0,1 gr + 0,064 gr/kg dozlarına maruz bırakılan sıçanlardan karaciğer, böbrek, testis ve beyin dokuları alınmış ve testler uygulanmıştır. Benomyl+Carbendazim karışımının MDA seviyesini arttırdığını, CAT etkisini de değiştirdiğini rapor etmişlerdir Alpertunga ve ark. Benomyl+Carbendazim karışımının toksisiteye sebep olabileceğini belirtmişlerdir [120].

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, çeşitli mantar hastalıklarına karşı kullanılan Luna Experience SC 400 fungusitinin sıçan karaciğer ve kan dokularında genotoksik etkisinin ve oksidatif hasar potansiyelinin etkisi araştırılmaya çalışılmıştır.

Denek olarak 35 Wistar Albino sıçanının kullanıldığı çalışmada 5 doz belirlenmiş ve 30 gün süreyle 48 saat arayla dozlar sıçanlara uygulanmıştır. Maruziyet süreci bitiminde sıçanlardan karaciğer ve kan dokuları alınmış ve testlerde kullanılmıştır.

Komet ve MN testlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre, Luna Experience SC 400 fungusitinin sıçan karaciğer ve kan dokularında doz artışına bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı genotoksik hasara sebep olduğu ortaya çıkmıştır.

Karaciğer ve kan dokusunda yapılan CAT ölçüm testleri sonucunda, Luna Experience SC 400 fungusitinin dokularda meydana getirdiği oksidatif hasarın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Ticari kimyasalın etken maddeleri Fluopyram ve Tebukonazol (Tebuconazole) isimli iki fungusittir. Bu çalışma, iki etken maddenin bir arada kullanıldığı ilk çalışma olduğundan önem taşımaktadır.

Sonuç olarak, kullandığımız kimyasalın (Luna Experience SC 400) kullandığımız deneklerde (Wistar Albino Dişi Sıçanlar) belirlediğimiz dozlarda (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) ve belirlediğimiz sürede (30 gün boyunca 48 saat arayla), deneklerin karaciğer ve kan dokularında MN ve komet testi sonucu genotoksik etkisinin olduğu, dokularda oksidatif strese sebep olduğu belirlenmiştir.

Elma, armut, ayva, kayısı, kiraz, şeftali, domates, biber, patlıcan, salatalık ve kabak gibi sosyoekonomik sınıflandırmaya takılmaksızın herkes tarafından tüketilen ürünlerin üretim süreçlerine aktif olarak kullanılan Luna Experience SC 400 fungusitinin yukarıda belirtilen etkileri göz önüne alındığında, kimyasalı üretimlerinde kullanan çiftçiler ve üreticilere gerekli bilgilerin verilmesi, çevresel maruziyetin azaltılması adına atılacak önemli bir adım olabilir.

KAYNAKLAR

- [1]. Lucero, L. *et al.* Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation research* **2000** 464, 255-262.
- [2]. Ranga Rao, G. V. a. R., O P and Rao, V R and Reddy, Y V R. Role of Biopesticides in Crop Protection: Present Status and Future Prospects. *Indian Journal of Plant Protection* **2007** 35, 1-9.
- [3]. Miller, G. T. *Living in the Environment*. Vol. 12th, 2001.
- [4]. Ahmed, F. Analyses of pesticides and their metabolites in food and drinks. *Trends in Analytical Chemistry* **2001** 20(11), 649-661.
- [5]. Jurgens, M. D., Crosse, J., Hamilton, P. B., Johnson, A. C. and Jones, K. C. The long shadow of our chemical past - High DDT concentrations in fish near a former agrochemicals factory in England. *Chemosphere* **2016** 162, 333-344.
- [6]. Ritter, S. K., Pinpointing Trends In Pesticide Use, 2009.
- [7]. Ahmed, M. T., Saad, M. M. and Mabrouk, S. S. Residues of some chlorinated hydrocarbon pesticides in rain water, soil and ground water, and their influence on some soil microorganisms. *Environment international* **1998** 24, 665-670.
- [8]. Demircan, Z. Marmara Denizi İzmarit ve Mezgit Balıklarında Organoklorlu Pestisit Artıkları İle İlgili Bir Ön İnceleme, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul, 1998.
- [9]. Damalas, C. A. and Eleftherohorinos, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health* **2011** 8, 1402-1419.
- [10]. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009, World Health Organisation, 3-5 (2009).
- [11]. Nayir, T. Isparta'da Anne Sütünde DDT ve Metabolitlerin Kalıntı Analizleri, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, 2009.
- [12]. Prince, A., Fan, T., Skoczinski, B. and Bushway, R. Development of an immunoaffinity-based solid-phase extraction for diazinon. *Anal Chim Acta*, 444:37-49. *Analytica Chimica Acta* **2001** 444, 37-49.
- [13]. Vural, N. *Toksikoloji*. 2 edn, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1996, 344-379.

- [14]. Çömelekoglu, Ü. and Mazmancı, B. Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan tarım işçilerinde eritrosit süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri. *Turkish Journal of Biology* **2000** 24, 483-488.
- [15]. McLaughlin, D. Fooling with Nature, <<http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/shows/nature/disrupt/sspring.html>> (2012) (Erişim Tarihi: 13.12.2016).
- [16]. Goldman, L. R. Managing pesticide chronic health risks: U.S. policies. *J Agromedicine* **2007** 12, 67-75.
- [17]. Miller, G. T. *Sustaining the Earth*. 6th Edition edn, Vol. 6th Edition, 2003, 211-216.
- [18]. What is a pesticide?, <www.epa.gov> (2007) (Erişim Tarihi: 5.5.2016).
- [19]. Randall, C., Crow, E., Hudak-Wise, C. and Kasai, J. *National Pesticide Applicator Certification Core Manual*. 2013.
- [20]. Gildea, R. C., Huffling, K. and Sattler, B. Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **2010** 39, 103-110.
- [21]. *Ridding The World of POPs: A Guide to The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. United Nations Environment Programme, 2005.
- [22]. Tieyu, W., Yonglong, L., Hong, Z. and Yajuan, S. Contamination of persistent organic pollutants (POPs) and relevant management in China. *Environment international* **2005** 31, 813-821.
- [23]. Uluocak, H. B. İzmir ve Aliğa Körfezinde Mevsimsel olarak Avlanan ve Bazı Ekonomik Balık Türlerinde Organik Klorlu Pestisit Kalıntılarının Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2000.
- [24]. Soyöz, M. and Özçelik, N. Ziraî mücadelede kullanılan pestisitlerin sitogenetik etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **2003** 10, 6-9.
- [25]. Weber, K. and Goerke, H. Persistent organic pollutants (POPs) in antarctic fish: levels, patterns, changes. *Chemosphere* **2003** 53, 667-678.
- [26]. Soares, W. L. and Porto, M. F. Pesticide use and economic impacts on health. *Rev Saude Publica* **2012** 46, 209-217.
- [27]. Benedetti, D. *et al.* Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation research* **2013** 752, 28-33.
- [28]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. and World Health Organization. *Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides*. 1st edn, Geneva Rome, 2002.

- [29]. Gaurav Kumar Pal, B. K. Antifungal activity of some common weed extracts against wilt causing fungi, *Fusarium oxysporum*. *OPEN ACCESS JOURNAL* **January 2013** Current Discovery 2:1, 62-67.
- [30]. in *Secondary "International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides"* (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002).
- [31]. Reynolds, J. D. International Pesticide Trade: Is There Any Hope For The Effective Regulation Of Controlled Substances? *Florida State University Journal of Land Use & Environmental Law* **1997**.
- [32]. Cook, S. M., Khan, Z. R. and Pickett, J. A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu Rev Entomol* **2007** 52, 375-400.
- [33]. Marrazza, G. Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. *Biosensors (Basel)* **2014** 4, 301-317.
- [34]. Metcalf, R. L., Insect Control, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2005).
- [35]. Se-A Kim, Y.-M. L., Ho-Won Lee, David R. Jacobs, Jr., Duk-Hee Lee. Can Inconsistent Association between Hypertension and Cognition in Elders be Explained by Levels of Organochlorine Pesticides? *PLoS ONE* **December 2, 2015**.
- [36]. Ruiz-Suarez, L. E. *et al.* Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico. *International journal of environmental research and public health* **2014** 11, 10444-10460.
- [37]. Kim, S. A., Lee, Y. M., Lee, H. W., Jacobs, D. R., Jr. and Lee, D. H. Greater cognitive decline with aging among elders with high serum concentrations of organochlorine pesticides. *PLoS One* **2015** 10, e0130623.
- [38]. Franz Müller, A. P. A. *Weed Control, 2. Individual Herbicides*. 15 September, 2010.
- [39]. EFSA. Conclusion on the peer review of triflusal, 195, 191-115 (2008).
- [40]. Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T. and Plant, A. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science* **2013** 341, 742-746.
- [41]. Coombs, A., Fighting Microbes with Microbes, January 1, 2013.
- [42]. Haverkate, F., Tempel, A. and Den Held, A. J. Interaction of 2,4,5-trichlorophenylsulphonylmethyl thiocyanate with fungal spores. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **12 May 1969** 75, 308-315.
- [43]. Latijnhouwers, M., de Wit, P. J. and Govers, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends Microbiol* **2003** 11, 462-469.
- [44]. Mueller, D. S. Fungicides: Terminology. *Integrated Crop Management News* **2006** 1250.

- [45]. Hogan, C. "Sulfur". The Encyclopedia of Earth (2011).
<<http://editors.eol.org/eoearth/wiki/Sulfur>> (Erişim Tarihi: 14.02.2017).
- [46]. Gerwick, B. C. *Pesticide Chemistry and BioScience: The Food-Environment Challenge* Royal Society of Chemistry, 1999.
- [47]. Hrelia, P. *et al.* The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* **1996** 11, 445-453.
- [48]. Luna Experience SC 400 Fungicide,
<<https://www.bayercropscience.com.tr/cs/ProductDetails.aspx?id=234>> (Erişim Tarihi: 13.11.2016).
- [49]. Zhang, Y. *et al.* Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. *Ecotoxicology and environmental safety* **2014** 108, 273-280.
- [50]. Avenot, H. F. and Michailides, T. J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **2010** 29, 643-651.
- [51]. Lunn, D. Fluopyram, New Zealand Food Safety Authority, Wellington, New Zealand, (2011).
- [52]. in *Secondary "Risk assessment of the fungicide Luna Privilege with the active substance fluopyram"* (Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 19.02.2014).
- [53]. Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* **1999** 12, 501-517.
- [54]. Sivikova, K., Dianovsky, J., Holeckova, B., Galdikova, M. and Kolesarova, V. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere* **2013** 92, 555-562.
- [55]. Douglas B. Tully *et al.* Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006** 215, 260-273.
- [56]. *Crop Protection Handbook*. Vol. 92, Willoughby, OH, 2006, 396.
- [57]. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13th Edition edn, Whitehouse Station, 2001, 1622.
- [58]. P.V. Shah, Midori Yoshida and Tasheva, M. Tebuconazole, WHO/JMPR, 503-564 (2010).
- [59]. Tebuconazole, SUMMARY OF TOXICOLOGY DATA, California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation Medial Toxicology Branch, (2008).
- [60]. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 6th edn, Vol. 1, Federal Republic of Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH 2003.

- [61]. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Office of Pesticide Programs, Annual Cancer Report 2015, U.S. Environmental Protection Agency, (2015).
- [62]. Pesticide Residues in Food, Report 2010, WHO/JMPR, (2010).
- [63]. Ferreira, D. *et al.* Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* **2010** 79, 914-921.
- [64]. Toni, C. *et al.* Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2011** 153, 128-132.
- [65]. Cavas, T. and Konen, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* **2007** 22, 263-268.
- [66]. Cavas, T. and Konen, S. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic toxicology* **2008** 90, 154-159.
- [67]. Pavlica, M., Klobucar, G. I., Mojas, N., Erben, R. and Papes, D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation research* **2001** 490, 209-214.
- [68]. Vrzoc, M. and Petras, M. Comparison of DNA damage in peripheral blood and spleen lymphocytes using the single-cell gel assay. *Mutation research* **1997** 379, 263-269.
- [69]. Eke, D. Perflorooktan Sülfonat ve Kurkumin Bileşiklerinin Sıçan Karaciğer ve Kan Dokularında Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2013.
- [70]. Dikilitaş M. and A., K. Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi". *HR.Ü.Z.F. Dergisi* **2010** 14(2), 77-89.
- [71]. Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., Devaraj, H. and Menon, V. P. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology* **2008** 243, 317-329.
- [72]. Cavas, T. Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus Testi Ve Agnor Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ Ve Laboratuar Koşulları Altında Araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2004.
- [73]. Fenech, M. *et al.* HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation research* **2003** 534, 65-75.
- [74]. Widel, M. *et al.* Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma; the updated analysis. *Int J Radiat Biol* **2001** 77, 631-636.

- [75]. Jagetia, G. C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D. and Vidyasagar, M. S. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation research* **2001** 491, 9-16.
- [76]. Schmid, W. The micronucleus test. *Mutation research* **1975** 31, 9-15.
- [77]. von Ledebur, M. and Schmid, W. The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutation research* **1973** 19, 109-117.
- [78]. Countryman, P. I. and Heddle, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation research* **1976** 41, 321-332.
- [79]. Hogstedt, B. and Karlsson, A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation research* **1985** 156, 229-232.
- [80]. Fenech, M. and Morley, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* **1985** 43, 233-246.
- [81]. Fenech, M. and Morley, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation research* **1986** 161, 193-198.
- [82]. Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation research* **1990** 239, 29-80.
- [83]. Schmid, W. *The micronucleus test for cytogenetic analysis*. In: Hollaender A edn, Vol. Chemical Mutagens, principles and methods for their detection, New York: Plenum, 1976, 4:31-53.
- [84]. Cruz, A. D., McArthur, A. G., Silva, C. C., Curado, M. P. and Glickman, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutation research* **1994** 313, 57-68.
- [85]. Yoshida, K. *et al.* Mitochondrial genotypes and radiation-induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro. *Oncol Rep* **2001** 8, 615-619.
- [86]. Roy, S. K., Thilagar, A. K. and Eastmond, D. A. Chromosome breakage is primarily responsible for the micronuclei induced by 1,4-dioxane in the bone marrow and liver of young CD-1 mice. *Mutation research* **2005** 586, 28-37.
- [87]. Hiroshi, S., Naohiro, I. and Kazuo, K. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)—Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutation research* **2005** 583, 133-145.

- [88]. Wu, J. Q., Kosten, T. R. and Zhang, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2013** 46, 200-206.
- [89]. Fatehi-Hassanabad, Z., Chan, C. B. and Furman, B. L. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *European Journal of Pharmacology* **2010** 636, 8-17.
- [90]. Al-Guborya, K. H., Fowlerb, P. A. and Garrel, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2010** 42, 1634–1650.
- [91]. Buonocore, G., Perrone, S. and Tataranno, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* **2010** 15, 186-190.
- [92]. Canbay, E., Çelik, K., Kunt, T., Ertemur, M. and Canbay, E. An Alteration in Glutathione Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation Levels in Patients with Laryngeal Carcinoma. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* **2002** 24 (4), 175-178.
- [93]. Deger, S. *et al.* [Determination of the status of lipid peroxidation and antioxidants in cattle infected with *Dictyocaulus viviparus*]. *Turkiye Parazitol Derg* **2008** 32, 234-237.
- [94]. Uz, A. Akut egzersizin kalp dokusu üzerine etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- [95]. Gutteridge, J. M. and Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press New York USA* **2000** 899, 107-208.
- [96]. Cemeli, E., Baumgartner, A. and Anderson, D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation research* **2009** 681, 51-67.
- [97]. Gibbs, R. A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **2004** 428, 493-521.
- [98]. Soylu, S. M. Rat Fizyolojisi. *Derman Medical Publishing* **2012** 19-25.
- [99]. Faith, R. E. and Hessler, J. R. Housing and Environment. *In: The laboratory rat. Academic Press*, **2006** 314-315.
- [100]. Langer, G. A. Interspecies variation in myocardial physiology: the anomalous rat. *Environ Health Perspect* **1978** 26, 175-179.
- [101]. Halpern, M. H. The dual blood supply of the rat heart. *Am J Anat* **1957** 101, 1-16.
- [102]. Jain, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- [103]. Schwabenbauer, C. Influence of the blood sampling site on some haematological and clinical-chemical parameters in Sprague-Dawley rats. *Comp Haematol Int* **1991** 1-112.

- [104]. Smith, C. N., Neptun, D. A. and Irons, R. D. Effect of sampling site and collection method on variations in baseline clinical pathology parameters in Fischer-344 rats. II. Clinical hematology. *Fundam Appl Toxicol* **1986** 7, 658-663.
- [105]. Şekeroğlu, V. and Atlı-Şekeroğlu, Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg* **2011** 68(4), 241-252.
- [106]. Wu, B. P. How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1994** 205(2), 97-105.
- [107]. Aebi, H. E., Bergmeyer, J. and Grabl, M. "Catalase. In: Methods of enzymatic analysis". Eds. *Verlag Chemie, Weinheim*, **1983** 3, 273-286.
- [108]. Guler, G. and Celik, A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Genotoxicity and Oxidative Damage Potential in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* **2016** 7, 5.
- [109]. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **1979** 95, 351-358.
- [110]. Celik, A., Ekinci, S. Y., Guler, G. and Yildirim, S. In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis block micronucleus test, and comet assay. *DNA and cell biology* **2014** 33, 148-154.
- [111]. Bowen, D. E. *et al.* Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation research* **2011** 722, 7-19.
- [112]. Marques, A. *et al.* Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan(R) in fish (*Anguilla anguilla* L.). *Pesticide biochemistry and physiology* **2016** 133, 52-58.
- [113]. Sutiakova, I. *et al.* Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in sheep subchronically exposed to the fungicide Euparen Multi (tolylfluanid). *Ecotoxicology and environmental safety* **2006** 64, 312-320.
- [114]. Schwarzbacherova, V. *et al.* Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango(R) Super in bovine lymphocytes. *Environ Pollut* **2017** 220, 255-263.
- [115]. Hao, H., lei, F., Nancai, Y., Wen, S. and Xiaojuan, Q. The single-cell gel electrophoresis assay to determine apoptosis induced by siRNA in Colo 320 cells. *African Journal of Biotechnology* **2009** 8 (16), 3731-3733.
- [116]. Ku-Centurión, M., Calderón-Segura, M. E. and Maldonado, E. Detection of DNA damage in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to Monceren® 250 SC fungicide through alkaline comet assay. *Toxicology Letters* **2016** 259, S183.

- [117]. Bianchi-Santamaria, A., Gobbi, M., Cembran, M. and Arnaboldi, A. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutation research* **1997** 388, 27-32.
- [118]. Tu, T. Y., Hong, C. Y., Sasado, T., Kashiwada, S. and Chen, P. J. Early life exposure to a rodent carcinogen propiconazole fungicide induces oxidative stress and hepatocarcinogenesis in medaka fish. *Aquatic toxicology* **2016** 170, 52-61.
- [119]. Joshi, S. C., Gulati, N., Sharma, B. and Sharma, P. Effects of Tebuconazole (A fungicide) on Reproduction of Male Rat. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* **2016** 4 (6), 1489-1494.
- [120]. Alpertunga, B., Catalgol, B. and Catalgol, S. Effects of benzimidazole fungicides, benomyl and carbendazim, on lipid peroxidation and antioxidant system in rat. *Toxicology Letters* **2009** 189, S212.



EK-1 ETİK KURUL RAPORU



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Proje Başvurusu Değerlendirme Sonucu

Projenin Niteliği			
Arastırma	Ön çalışma	Eğitim	
Projenin Adı/Dersin Adı:	Luna Experience-SC 400 Fungüsü'nün Siçan Karaciğer ve kan dokularında Genotoksik etkisinin ve Oksidatif Hasar Potansiyelinin Araştırılması		
Başvuru Tarihi:	27/10/2014		
Başvuru No:	31		
Projenin/Dersin Yürütücüsü:	Prof. Dr. Ayla ÇELİK		
Fakülte/Bölüm	Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü		
Karar Tarihi:	30/10/2014		
Değerlendirme Sonucu			
Uygun ✓	Düzeltilmesi Gerekir	Koşullu Olarak Uygun	Uygun Değildir
Karar Bilgileri:	<p>Yürürlükte olduğumuz "Luna Experience-SC 400 Fungüsü'nün Siçan Karaciğer ve kan dokularında Genotoksik etkisinin ve Oksidatif Hasar Potansiyelinin Araştırılması" adlı çalışmamıza onay verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p style="text-align: right;"><i>Tahsin Çolak</i> Prof. Dr. Tahsin ÇOLAK HADYEK Başkanı</p>		
HADYEK ÜYELERİ	Katılım	Kararı Onayı	İmza
Prof. Dr. Tahsin ÇOLAK	Evet ✓ Hayır	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Tahsin Çolak</i>
Prof. Dr. Bahar TILNÇTAN	Evet ✓ Hayır	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Bahar Tılınçtan</i>
Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK	Evet ✓ Hayır ✓	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Hakan Öztürk</i>
Prof. Dr. Ali NAYCI	Evet ✓ Hayır	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Ali Nacı</i>
Dr. Vet. Hek. Tamer YENER	Evet ✓ Hayır	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Tamer Yener</i>
Uzm. Vet. Hek. Cem FIRAT	Evet ✓ Hayır ✓	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Cem Fırat</i>
Av. Lale DAĞLI	Evet ✓ Hayır	Onaylıyorum ✓ Onaylamıyorum	<i>Lale Dağlı</i>

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Cuma AKTAŞ

Doğum Tarihi : 29.09.1987

E-mail : aktas.cuma@gmail.com

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2006-2012
Yüksek Lisans	Genetik Toksikoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2017

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Guler G., Aktaş C., Çelik A., Duysak M.İ. "Fenthion'un Genotoksik Etkisi, Tek Hücre Jel Elektroforezi-Sitokinesis Blok Mikronukleus" 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 2014.
2. Guler G., Aktaş C., Çelik A. "Fluopyram/Tebakonazol Kombinasyonlu Fungusit (Luna Experience -SC 400) Genotoksitesi-Tek Hücre Jel Elektroforezi-Kardeş Kromatid Değişimi" 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 2014.