

**ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN İNSAN
LENFOSİTLERİ ÜZERİNE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN MİKRONUKLEUS, KOMET, GAMA
H2AX TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SERPİL KÖNEN ADIGÜZEL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**MERSİN
ARALIK – 2014**

**ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN İNSAN
LENFOSİTLERİ ÜZERİNE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN MİKRONUKLEUS, KOMET, GAMA
H2AX TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

SERPİL KÖNEN ADIGÜZEL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. R. Serap ERGENE**

**MERSİN
ARALIK – 2014**

Serpil KÖNEN ADIGÜZEL tarafından Prof. Dr. R. Serap ERGENE danışmanlığında hazırlanan “Çevresel Kirleticilerin İnsan Lenfositleri Üzerine Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus, Komet, Gama H2AX Test Yöntemleri İle Araştırılması ” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. R. Serap ERGENE


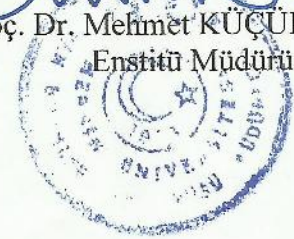
Prof. Dr. Yasemin KAÇAR

Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Doç. Dr. Servet ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Dilek BATTAL

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/01/2015 tarih ve 2015.02/...80..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Doç. Dr. Mehmet KÜÇÜKASLAN
Enstitü Müdürü


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

ÇEVRESEL KİRLİTİCİLERİN İNSAN LENFOSİTLERİ ÜZERİNE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN MİKRONUKLEUS, KOMETA, GAMA H2AX TEST YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Serpil KÖNEN ADIGÜZEL

ÖZ

Bu çalışmada, bir insektisit olan spirotetramat ve nanopartikül olan seryum dioksit'in genotoksik etkileri 8 sağlıklı bireyin periferik kan lenfositlerinde *in vitro* mikronukleus (MN) testi, kometa testi ve gama H2AX testi kullanılarak araştırılmıştır.

İnsan periferik lenfositleri 25, 50, 75 µg/ml'lik spirotetramat dozlarına 48 saat ve 72 saat süresince, seryum dioksit nanopartikülünün 6, 12 ve 18 µg/ml'lik konsantrasyonuna 3 saat ve 24 saat maruz bırakılmışlardır. Hidrojen peroksit 100µM'lik tek dozda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Spirotetramat, insan periferik kan lenfositlerinde 48 ve 72 saatlik muamelede hasarlı hücre yüzdesini arttırmıştır. 48 saatlik maruziyette her üç dozda da artış gözlenmiştir. 75 µg/ml'lik dozda meydana gelen artış (P<0.001) 25 µg/ml'lik ve 50 µg/ml'lik dozdan (P<0.05) daha yüksek oranda olmuştur. Yetmiş iki saatlik uygulama süresi boyunca genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesindeki artış devam etmiştir. Fakat en yüksek hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi pozitif kontrol grubunda olmuştur. İnsan periferik lenfositlerinde elde edilen mikronukleus bulguları doza ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir.

Seryum dioksit, insan periferik kan lenfositlerinde genetik hasar indeksini ve hasarlı hücre yüzdesini arttırmıştır. Fakat negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak en yüksek doz grubunda hasarlı hücre yüzdesinde anlamlı bir artış söz konusu olmuştur (P<0.05). Genetik hasar indeksine bakıldığında ise orta ve yüksek dozda negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı artış gözlenmiştir (P<0.05). Pozitif kontrol grubu negatif kontrol ile karşılaştırıldığında hem hasarlı hücre yüzdesinde hem de genetik hasar indeksinde anlamlı artış gözlenmiştir (P<0.001). Mikronukleus çalışmasından elde edilen bulgular, seryum oksitinin 24 saatlik maruziyeti sonunda insan periferik lenfositlerinde mikronukleus oranını istatistiksel olarak arttırmıştır. Gama H2AX test sonuçları da mikronukleus testine benzer sonuçlar göstermiştir.

Sonuç olarak, hem spirotetramat hem de seryum dioksit'in test edilen dozları insan lenfosit kültüründe genotoksik etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Spirotetramat, seryum dioksit, kometa, mikronukleus, gama H2AX.

Danışman: Prof. Dr. R. Serap ERGENE, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı.

GENOTOXICITY ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ASSESSED BY THE MICRONUCLEUS, COMET AND GAMMA H2AX TEST

Serpil KÖNEN ADIGÜZEL

ABSTRACT

In the present study, genotoxic effects of a widely used insecticide, spirotetramat and nanoparticle cerium oxide were evaluated on peripheral lymphocytes were obtained by venipuncture from eight healthy donors, using the micronucleus test, comet test and gamma H2AX analysis.

Human peripheral lymphocytes were treated with 25, 50, 75 µg/ml doses of Spirotetramat for 48 and 72 hours periods, in addition cells were exposed to 6, 12 ve 18 µg/ml doses of cerium oxide for 3 and 72 hours periods. Hydrogen peroxide at a single dose of 100 µM was used as positive control.

Treatment with 25, 50 and 75µg/ml doses of spirotetramat for 48 and 72 hours significantly increased of percentage at damaged cell In 48 hours process, growth was observed in all three doses. Occuring increase at 75 µg/ml doses higher than 25 and 50µg/ml doses. Growth at rate on genetic damage index and damage cell, continued during the implementation period. But, positive control group has the highest percentage at genetic damage index and damage cell. Micronucleus on human peripheral lymphocytes have increased depending on dose and time.

Cerium oxide has caused to rise percentage at genetic damage index and damage cell on the human peripheral lymphocytes. However, compered with negative control, damage cell has a significant increases in the highest dose group statistically(P<0.05). According to genetic damage index, it had meaningfull increase in middle and high doses when compared with negative control group. When the comparision with positive and negative control group, in both genetic damage index and genetic damage cell had a significant increment. Obtaining findings from study of micronucleus have led to increase on human peripheral lymphocytes during the process of 24 hours on cerium oxide statistically.

Consequently, both spirotetramat and cerium dioxide has genotoxic potential at tested doses on human peripheral lymphocytes.

Key words: Spirotetramat, Cerium dioxide, Comet, Micronucleus, Gamma H2AX.

Supervisor: Prof. Dr. R. Serap ERGENE, Department of Biology, University of Mersin.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve çalışmalarım sırasında bana rehberlik eden, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. **Serap ERGENE**'ye, ayrıca çalışmalarımın ve sonuçlarımın değerlendirilmesinde görüş ve önerilerinden yararlandığım sayın Prof. Dr. **Yasemin KAÇAR**'a ve Prof. Dr. **M. Emin ERDAL**'a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Genetik Laboratuvarında birlikte çalıştığımız ve çalışmam esnasında benden yardımlarını esirgemeyen biyolog arkadaşım **Tuğçe ŞAHİN** ve **Gizem GÜLER**'e, verilerin değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen **Asena Ayça ÖZDEMİR**'e, çalışmam için gönüllü olarak kan veren arkadaşlarıma ve biyoloji bölümü öğrencilerine teşekkürü borç bilirim.

En zor zamanlarımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim **KÖNEN** ve **ADIGÜZEL** ailelerine, ayrıca zamanlarından fedakarlık eden eşim **Ali Osman ADIGÜZEL**'e ve oğlum **Ahmet Aral ADIGÜZEL**'e çok teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu yöneticilerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. GENETİK TOKSİKOLOJİ.....	4
2.1.1. Mikronukleus Testi.....	6
2.1.2. Komet Testi.....	8
2.1.3. Gama H2AX Testi.....	11
2.2. GENETİK TOKSİKOLOJİ TESTLERİNDE İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜ.....	16
2.3. PESTİSİTLER.....	17
2.3.1. Pestisitlerin Genotoksik Etkileri.....	20
2.3.2. Spirotetramat.....	29
2.3.2.1. Spirotetramatın genotoksik etkileri.....	30
2.4. NANOPARTİKÜLLER.....	32
2.4.1. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri.....	33

2.4.2. Seryum Dioksit.....	44
2.4.3. Seryum Dioksitin Genotoksik Etkileri.....	44
2.5. HİSTON PROTEİNLERİ.....	48
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	50
3.1. MATERYALLER.....	50
3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	50
3.1.2. Tamponların Hazırlanması.....	51
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	51
3.2. YÖNTEM.....	52
3.2.1. Kanların Alınması.....	52
3.2.2. Mikronukleus Testi İçin Kültürün Oluşturulması.....	53
3.2.2.1. Mikronukleus testinin gerçekleştirilmesi.....	53
3.2.3. Lenfosit İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi.....	54
3.2.3.1. Lenfosit sayımı.....	54
3.2.4. Komet Testi İçin Lenfositlerin Kültüre Ekilmesi.....	55
3.2.4.1. Komet testinin gerçekleştirilmesi.....	55
3.2.5. Gama H2AX Testi İçin Lenfositlerin Kültüre Ekilmesi.....	56
3.2.5.1. Gama H2AX testinin gerçekleştirilmesi.....	56
3.2.6. Seryum Dioksit'in SEM'de Karakterizasyonu.....	57
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	57

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	59
4.1. BULGULAR.....	59
4.1.1. Spirotetramat'ın Genotoksik Etkileri.....	59
4.1.1.1. Mikronukleus verileri.....	59
4.1.1.2. Komet verileri.....	60
4.1.2. Seryum Dioksit'in Genotoksik Etkileri.....	64
4.1.2.1. Mikronukleus verileri.....	64
4.1.2.2. Komet verileri	65
4.1.2.3. Gama H2AX verileri.....	67
4.2. TARTIŞMA.....	71
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. İnsan H2AX, γ -H2AX antikoru ve peptidlerinin ticari olarak ulaşılabilirliği.....	15
Çizelge 2.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya L)*.....	19
Çizelge 2.3. Ege ve Akdeniz Bölgeleri ile Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinin Türkiye pestisit tüketimindeki preparat olarak payları.....	20
Çizelge 2.4. Pestisite maruz kalan insanlarda gerçekleştirilen sitogenetik çalışmalar.....	22
Çizelge 2.5. Test Bileşeninin Terminolojisi.....	30
Çizelge 2.6. Endüstriyel Nanopartiküllerin İn Vitro Genotoksitesine Dair Seçilmiş Çalışmalar.....	37
Çizelge 2.7. Seryum oksitin fiziksel özellikleri.....	44
Çizelge 4.1. Spirotetramat maruziyetine ait mikronukleus ve CBPI değerleri.....	60
Çizelge 4.2. Spirotetramat maruziyetine ait komet bulguları.....	62
Çizelge 4.3. Seryum oksit’e ait mikro nukleus ve CBPI değerleri.....	65
Çizelge 4.4. Seryum oksit maruziyetine ait komet bulguları.....	66
Çizelge 4.5. Seryum dioksit maruziyetine ait gama H2AX bulguları.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları.....	5
Şekil 2.2. Mikronukleus oluşum mekanizması.....	8
Şekil 2.3. Kuyruk uzunluğuna göre kometa tipleri.....	10
Şekil 2.4. İmmünofluoresan boyamadan sonra, insan periferik lenfositlerinde gama γ -H2AX ışınması DvLight 488 ile yeşil noktalar şeklinde görselleştirilmiştir.(A)Normal bir hücre: γ -H2AXışınması göstermemiş. (B)Normal hücrenin DAPI ile boyanış hali (C) İki γ -H2AX ışınması gösteren hücre (D) İki ışınma veren hücrenin DAPI ile boyanmış hali (E) 30'dan fazla ışınma veren hasarlı hücre (F)Aynı hücrenin DAPI ile boyanmış hali (G) Sayılamayacak kadar fazla ışınma veren hasarlı hücre (H) Aynı hücrenin DAPI ile boyanmış hali.....	12
Şekil 2.5. Gama H2AX ortaya çıkaran uygulamalar.....	14
Şekil 2.6. A)Gama H2AX'in biyo belirteç olarak kullanıldığı alanlar. B) Yıllara göre gama H2AX yayınının sayısındaki artış.	14
Şekil 2.7. Spirotetramat'ın kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.8. Nanopartiküllerin kullanım alanları.....	33
Şekil 2.9. Nanopartiküllerin yaşam siklusu ve çeşitli ekosistemlerde insanların nanopartiküllere maruziyeti.....	34
Şekil 2.10. Nanopartiküllerin hücresel etkileri.....	35
Şeki 2.11.Genotoksisite ve Karsinojeniteye Neden Olan Nanopartiküllerin Hücresel Proseslerle İlişkisi.....	36
Şekil 2.12. İnsan vücudunun nanopartiküllere maruz kalma yolları, etkilenen organlar ve ortaya çıkabilecek hastalıklar.....	36
Şekil 3..1. Lenfosit izolasyonu.....	54
Şekil 3.2. Seryum dioksit nanopartiküllerinin SEM'deki görüntüsü.....	57
Şekil 4.1. İnsan lenfosit hücrelerinde Tip 0 kometa görüntüleri.....	68
Şekil 4.2. İnsan lenfosit hücrelerinde Tip 3 kometa görüntüleri.....	68
Şekil 4.3. İnsan lenfositlerinde Tip 1 Tip 0 kometa görüntüleri.....	69
Şekil 4.4. İnsan lenfositlerinde Tip 4 kometa görüntüsü.....	69

Şekil 4.5. İnsan lenfositlerinde binukleuslu hücrede mikronukleus görüntüsü.....	70
Şekil 4.6. Tek nukleuslu, iki nukleuslu, üç nukleuslu ve dört nukleuslu lenfosit görüntüsü.....	70
Şekil 4.7. Gama H2AX ışınması gösteren lenfosit hücreleri.....	70
Şekil 4.8. Gama H2AX ışınması vermeyen hasarsız lenfosit ve ışınma veren hasarlı lenfosit.....	70



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

C: Karbon

CA : Kromozom Aberasyonu

CBMN : Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikronukleus Testi

CBPI : Sitokinezi Bloke Hücrelerde Proliferasyon İndeksi

cDNA : Komplomenter DNA

CeO₂ : Seryum Dioksit

COOH: Karboksil

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DSB: DNA Çift Zincir Kırığı

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

ENPs : Endüstriyel Nanopartiküller

EPR : Elektronik Paramagnetik Rezonans

F: Fare

H2A : Histon 2A

H2AX: Histon 2AX

H2B : Histon 2B

H3 : Histon 3

H4: Histon 4

HPLC-MS : Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi

IWGT: Uluslar Arası Genotoksisite Testi Çalışma Grubu

K: Keçi

KCl : Potasyum Klorür

LMPA : Düşük Erime Noktalı Agar

Lys 5 : Lizin

MN : Mikronukleus

N : Azot

NaOH : Sodyum Hidroksit

NMPA : Normal Erime Noktalı Agar

PBS : Fosfat Tampon Tuzu

PHA : Fitohemaglutinin

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rH2AX: Rekombinant Histon 2AX

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

SCE : Kardeş Kromatit Değişimi

SCGE: Tek hücre jel elektroforezi

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

T: Tavşan

US EPA:Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı

ZnO : Çinko Oksit

γ : Gama

γ H2AX: Gama Histon 2AX

1.GİRİŞ

İnsanlar, yaşamlarını devam ettirebilmek için çevrede bulunan birçok bileşene ihtiyaç duymaktadır. Çevrede bulunan bu bileşenler insanların yaşamını bazen kolaylaştırırken bazen de baş edilmesi güç problemler ortaya çıkarmaktadır. Dünya üzerinde yaşayan birey sayısının ve ihtiyaçlarının artması daha ileri teknolojilerin üretilmesi ile birlikte tarımsal üretim alanı olarak kullanılan yerlerin yerleşim bölgelerine dönüştürülmesine sınırlı olan kaynakların tüketilmesine, yaşam alanlarının onarılmaz biçimde kirletilmesine ve doğal kaynakların yok edilmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı, bilim insanların üzerine yoğunlaşmasını gerektiren güncel konulardan biri de; teknolojiyen etkin biçimde faydalanırken ortaya çıkan ya da çıkabilecek sorunların nasıl çözümlenebileceğidir [Türküm, 1990].

Çevre sorunlarının karmaşık yapısı içerisinde, bugün önemli bir sorunu da insanoğlunun ihtiyacı olan besini sağlamak oluşturmaktadır. Bireysel ihtiyaçların başında gıda gelmektedir. Artan nüfusun besin ihtiyacı doğal ortamdan sağlanamayacak duruma geldiği için tarım toplumuna geçiş söz konusu olmuştur [Kılıç, 2013]. Sanayi ve teknolojinin gelişmesiyle birlikte tarım toplumunda birim alandaki verimi arttırmak amacıyla pestisit kullanımı artmaya başlamıştır. Pestisitler, modern tarımın tamamlayıcı bir bileşeni halindedir. Bugün tüm tarımsal alanlar en az bir ya da daha fazla sayıda pestisit uygulamasına gereksinim duymaktadır. Bu nedenle pestisitler tüm dünyada kullanımından vazgeçilemeyecek maddeler olarak kabul edilmektedir [Dağ vd., 2007]. İdeal bir pestisit yalnızca hedef organizmayı etkileyen, ekosistemde uzun süreli olarak kalıcı olmayan ve zararlı çevresel etkileri olmayan kimyasal madde olarak tanımlanmasına rağmen, günümüzde birçok pestisit ekosistemler arasında taşındığı ve hedef olmayan organizmalarda direkt ya da dolaylı olarak çeşitli toksik etkilere yol açabildikleri bilinmektedir [Mansour, 2004]. Bu toksik etkilerden özellikle kalıtım materyali DNA üzerinde ortaya çıkabilecek genotoksik hasarların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [Madle vd., 2000].

Çevrede kirliliğe neden olan diğer bir etmen de teknolojinin gelişimiyle ortaya çıkan ve çeşitli alanlarda kullanılan nanopartiküllerdir. Geçtiğimiz on yıl

boyunca, nanopartiküllerin çeşitli biyomedikal uygulamalardaki (hücre izleme, biyosensör, kontrast görüntüleme, hedefe yönelik ilaç geliştirme, doku mühendisliği) ve mühendislikteki kullanımı yükselmiştir [Sakhtianchi vd., 2013]. Yüz nanometreden daha küçük boyuttaki partiküller nanopartikül olarak isimlendirilirler [Horie vd., 2012]. Nano büyüklükteki partiküller, etkili ve yararlı karakteristiklere sahiptir. Fakat aynı özellikler insan sağlığı için problem olabilmektedir [Karlsson, 2010].

Hem nanopartiküllerin hem de pestisitlerin artan sayısı ve miktarı, onların uygulamalarının da yükselmesiyle farklılaşarak çevreye girmektedir. Hem insanlar hem de diğer canlılar çevreye giren nanopartiküllere maruz kalmaktadır [Gaiser vd., 2012]. Ayrıca tüm insanlar, mesleki olarak veya çevresel kontaminasyonlar sonucu zorunlu olarak pestisitlere maruz kalmaktadır [Bolognesi, 2003]. Bununla birlikte, pestisitlerin ve nanopartiküllerin sağlık üzerine potansiyel etkileri de tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çevrede bulunan maddelerin canlılar üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çevrede bulunan ve canlıların maruz kaldığı bilinen her maddenin çevresel araştırma ve risk değerlendirme süreçlerinde, genetik etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla; hem laboratuvar hem de doğal ortamlarda uygulanabilen ve düşük maliyetli bir teknik olan mikronükleus testi, yapısal DNA hasarlarının belirlenmesi amacı ile yaygın biçimde kullanılmaktadır [Çavaş, 2004]. Son yıllarda, mikronükleusun yanı sıra diğer bazı morfolojik nükleus bozukluklarının da genetik toksikoloji göstergesi olarak kullanılabilmesi öne sürülmektedir [Carrasco vd., 1990]. Bunlardan özellikle lob ve tomurcuklanma gibi bazı nükleus düzensizliklerinin genotoksik etkileşimler sonucu ortaya çıkabileceği ve hatta yeni bir mikronükleus oluşum mekanizması için temel oluşturabileceği öne sürülmektedir [Shimizu vd., 1998]. Ek olarak son yıllarda gerek pestisit gerekse nanopartikül hasarlarının belirlenmesinde komet testi ve gama H2AX testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Komet testi, genetik materyalde meydana gelen hasarı zincir kırıklarının jelde yürütülmesi ile görselleştirmektedir. Gama H2AX testinde ise meydana gelen hasar, tüm organizmalarda korunmuş bir histon proteini olan

H2AX'in olası hasar durumunda ışına vermesiyle gösterilmektedir [Karlsson, 2010; Valdiglesias vd., 2011].

Buna ilişkin olarak, kompleks kimyasal karışımlara maruziyetin genetik risk değerlendirmelerinde insan popülasyonlarının kullanımı elverişlidir [Bolognesi, 2003]. Bir çok in vitro genotoksisite araştırmasında insan lenfosit kültürü yaygın olarak kullanılmaktadır.

Spirotetramat son yıllarda en yaygın kullanılan insektisitlerin arasında bulunan, insektisitlerin yeni bir sınıfı olan tetramik asit sınıfına ait bir insektisittir. İşlevsel olarak lipit biyosentez inhibitörüdürler. Hedef organizmada yağ içeriğinde azalma, büyümede inhibisyon ve üremede bozulma meydana getirdiği görülmüştür [Chen ve Stark, 2010]. Anormal sperm hücresi, sperm hareketliliğinde düşüş meydana getirdiğinden üreme ile ilgili zararlı nesnelere 3. Grubuna yerleştirilmiştir [McCormack, 2009]. İnsektisit direkt hedefi olmayan insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri henüz çalışılmamıştır.

Seryum dioksit nanopartikülleri; tıpta, kozmetikte, cilalama materyallerinde ve otomotiv yakıt eklentilerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir [Auffan vd., 2009]. Seryum dioksitin canlılar üzerindeki etkilerine dair farklı bulgular veri tabanlarında yer almaktadır. Bazı çalışmalarda seryum dioksitin genotoksik özelliğe sahip olduğu belirtilirken [Auffan vd., 2009; Barbara vd., 2012], bazı çalışmalarda ise antijenotoksik özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir [Lee vd., 2009; Pierscionek vd., 2010]. Seryum dioksitin hematolojik değişikliklere neden olabileceği yönünde birkaç çalışma bulunmaktadır [US EPA,2009]. Fakat insan lenfosit hücrelerindeki genotoksik etkisi henüz çalışılmamıştır.

Yukarıda anlatıldığı üzere hem insektisit spirotetramat hem de nanopartikül seryum dioksitin insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerine dair bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle, bu çalışmada bu iki maddenin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerinin mikronukleus, komet ve gama H2AX testi kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

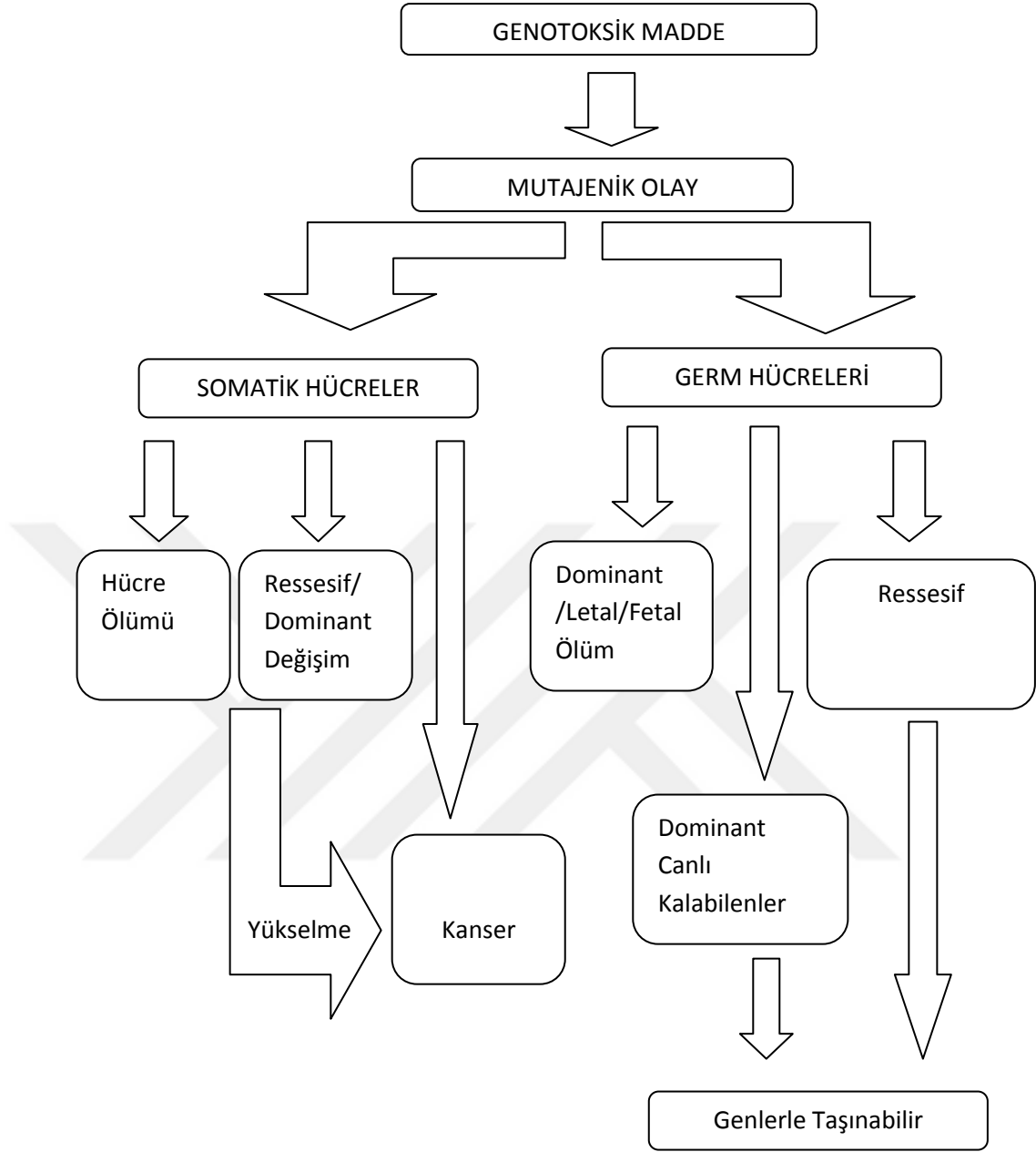
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.GENETİK TOKSİKOLOJİ

Son yıllarda sanayileşmenin ve teknolojinin artmasıyla birlikte genotoksik maddelerin üretim ve kullanım miktarlarında önlenemez bir artış gerçekleşmiştir. Bu artış beraberinde farklı olumsuzlukları getirmiştir. Biyolojik zenginliklerde kayıp, habitat kaybı ve nesilden nesile taşınan olumsuz mutasyonlar bu olumsuzluklar arasında sayılabilir.

İlk olarak 1927’de X-ışınlarının *Drosophila*’da mutasyon oranlarını normalden 15.000 kat daha fazla arttırdığını belirleyen Muller’in [Muller, 1927] çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji bugün, gelişen teknoloji ile artan risk ve analiz yöntemlerine bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir [Çavaş, 2004].

Genetik toksikoloji, temel olarak kalıtım materyali DNA üzerinde meydana gelen toksik etkileri inceleyen bilim dalıdır. DNA içerisinde kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, replike edildikten sonra mümkün olduğunca aslına uygun bir biçimde oğul döllere aktarılmalı zorundadır. Bu esnada, gerek normal biyolojik süreçler sonucu gerekse DNA’nın doğrudan ya da dolaylı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenlerle etkileşimi sonucu çeşitli bozulmalar meydana gelebilmektedir. Bu yolla kalıtım materyali DNA üzerinde hasarlara yol açan etmenleri tanımlamak için “genotoksik” terimi kullanılmaktadır [Brusick, 1987]. Genotoksik etki, gonodların gamet hücrelerini etkileyerek ya gametlerin sayıca azalmasına neden olur veya gametlerdeki genetik bilgiyi değiştirir. Böylece iki ayrı cinsiyete ait gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot ölmezse anne ve babadan farklı döller oluşur. Genotoksik etki, somatik doku hücrelerinde de olabilir, bu takdirde diğer nesillere geçmez. Bu değişim daha çok karsinogenezise zemin olması açısından önem taşır [Vural, 2005]. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları Şekil 2.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Genotoksik maddelerin etkileşim yolları ve olası sonuçları [Vural, 2005].

Genetik toksikoloji testlerinde ana hedef DNA molekülü olduğundan dolayı, elde edilen sonuçlar aynı zamanda insan sağlığı ile ilgili olarak ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılmaktadır. Bu nedenle bir türde DNA hasarı oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, diğer türlerde de benzer etkiler gösterebileceğini söylemek mümkündür. Bugün genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile; mikroorganizmalar, böcekler, bitkiler ve omurgalı hayvanlar üzerinde

uygulanabilecek olan 200'den fazla kısa-süreli test metodu bulunmaktadır [Waters vd., 1988].

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikleri ise şöyle sıralayabiliriz;

- Uygulama açısından basit olması.
- Genetik hasarları belirlemede etkin olması.
- Hızlı sonuç vermesi.
- Ekonomik açıdan ucuz olması.
- Analiz için az sayıda örneğin yeterli olması.

Günümüzde bu kriterleri sağlayan, birçok doku ve organizma üzerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak en yaygın kullanılan test metodlarının başında mikronukleus testi gelmektedir [Scarpato vd., 1990; Ma, 1981]. Son yıllarda kimyasalların genotoksik etkileri araştırılırken tek test metodu kullanmak yerine kombine test metodları kullanılarak sonuçların uyumluluğu ve testlerin güvenilirlikleri de test edilmektedir. En çok kullanılan kombine test sistemleri arasında ise mikronukleus ve komet testinin birlikte kullanımı yer almaktadır. Bu çalışmada da mikronukleus testine ek olarak komet testi ve gama H2AX testi kullanılmıştır.

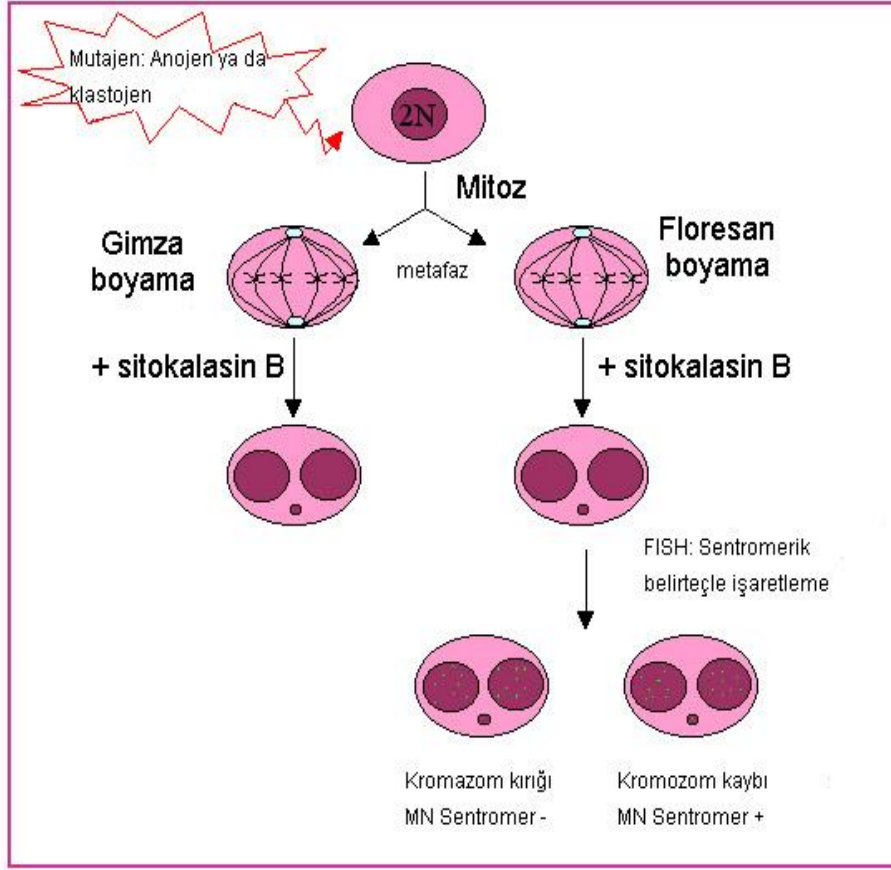
2.1.1. Mikronukleus Testi

Mikronukleus ilk olarak 1800'lerin sonunda 1900'lerin başında Jolly'nin terminolojisine göre "intraglobulerden ayrılan yapı" ya da Howell tarafından "nuklear materyalin fragmenti" olarak isimlendirilmiştir ve yüzyıldan daha fazla zamandır eritrositlerin sitoplazması içinde tanımlanmıştır. Bu yapıları hematologlar "Howell-Jolly cisimleri" olarak bilirler. Benzer yapılar diğer hücre tiplerinde "nukleus fragmenti" veya "mikronuklei" olarak tanımlanmıştır (1937 yılında Brenneke tarafından fare ve rat embriyolarında, 1951'de Thoday tarafından Vicia faba'da). Evans 1959 yılında sitogenetik hasarların gösterilmesinde belirteç olarak mikronukleusun kullanışlı olduğunu keşfetmiştir. Ajanların genotoksik potansiyelinin test sistemlerindeki kararlı ilerlemesi Boller ve Schmid'in çalışmaları ile olmuştur [Kirsch-Volders vd., 2003].

Mikronukleus DNA düzeyindeki eklenti ve kayıplar sonucu oluşabilir. Ya da kromozom ayrılmalarından, kromozomlardan ve protein düzeylerindeki değişimlerden kaynaklanabilir. Kromozom kayıplarından ya da kromozom fragmentlerinden oluşan mikronukleus formasyonu mitoz ya da mayoz bölünmeyi gerektirir [Kirsch-Volders vd., 2003].

Farklı hücre tiplerinde *in vitro* mikronukleus testinin geniş uygulanabilirliği ve sayımının kolay olması, sitogenetik anormalliklerin değerlendirilmesinde mikronukleus testini etkili bir araç yapmıştır. Fakat mikronukleus oluşum mekanizması tam anlaşılmış değildir ve hücre üremesi ile mikronukleus oluşumunda yeterli metodun bulunmaması *in vitro* genotoksisite testlerinde *in vitro* mikronukleus testinin geçerli olmasını geciktirmiştir. Sitokinezi bloke edilmiş mikronukleus testi Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiştir. Sitokalsin B kullanılarak iki nükleuslu hücrelerde mikronukleus değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir [Kirsch-Volders vd., 2003].

Mikronukleus oluşum mekanizmasına dair yapılan çalışmalar asentrik fragmentleri içeren çift zincir DNA kırıklarının mikronukleus oluşturabileceğini göstermiştir. Ayrıca mitozda meydana gelen başarısızlıklar sonucu tam kromozomlardan mikronukleus oluştuğu sonucuna varılmıştır. Bu gelişmeler sonucunda *in vitro* mikronukleus testi ile anojenik ve klastojenik ajanlar ayırtedilebilecektir [Kirsch-Volders vd., 2003]. Şekil 2.2.'de mikronukleus oluşum mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Mikronükleus oluşum mekanizması.

İlk olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan mikronükleus testi, farklı etmenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodu haline gelmiştir. İnterfaz hücrelerinde mikronükleus sayımı teknik açıdan metafaz analizlerine oranla çok daha kolay ve hızlı bir yöntemdir. Bu nedenle son yıllarda bir genotoksisite test metodu olarak mikronükleus testine olan ilgi artmış ve memeliler dışındaki diğer omurgalılar yanında bazı omurgasız hayvanlar ile bitkilere de uygulanmaya başlanmıştır [Scarpato vd., 1990; Ma, 1981; Kosmider vd., 2000; Kataeve vd., 2012; Udroui, 2008].

2.1.2.Komet Testi

Çevrede bulunan genotoksik maddelerin kalıtım materyalinde meydana getirdiği hasarı belirlemek önemlidir. Bu amaçla kullanılan birçok test metodu bulunmaktadır. Bunlardan biri de “tek hücre jel elektroforezi” ya da “komet” olarak bilinen test sistemidir. Ostling ve Johanson [Ostling ve Johanson, 1984], tek hücre jel

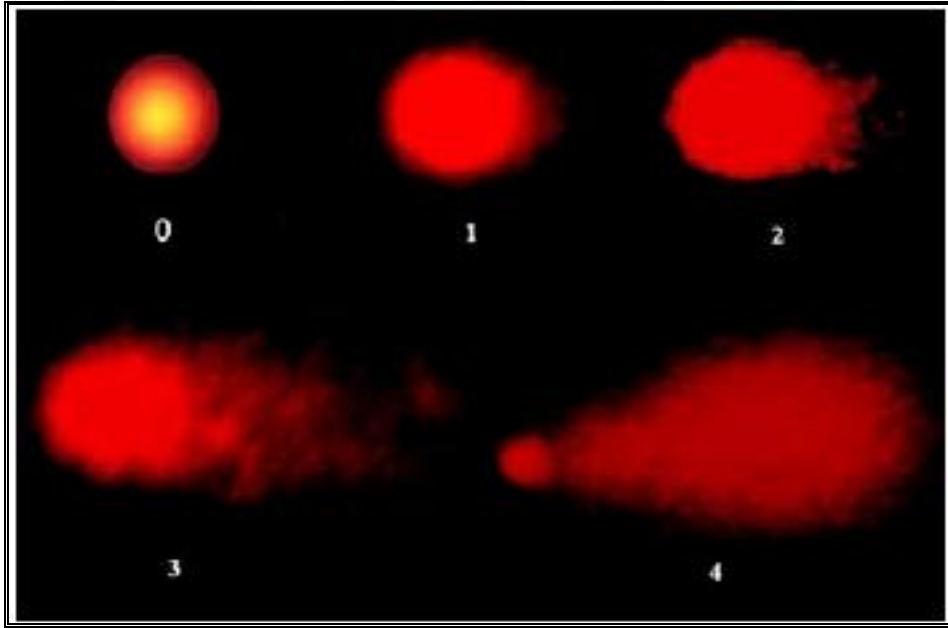
elektroforezi (SCGE) veya komet testi olarak bilinen mikrojel elektroforez tekniğini kullanarak hücrelerdeki DNA hasarını ilk belirleyen kişilerdir. Bununla birlikte, onlar nötral şartları kullanarak sadece DNA'daki çift zincir kırıklarını belirleyebilmişlerdir. Daha sonra bu test, Singh [Singh vd., 1988] tarafından alkalın şartlara adapte edilmiştir. Bu yöntem testin daha duyarlı olmasını sağlamıştır. Böylece bu yöntemle DNA'daki hem çift zincir hem de tek zincir kırıklarının belirlenmesi sağlanmıştır. Yöntem kullanılmaya başlandığından bu yana çeşitli basamaklarda (lizis, elektroforez) modifiye edilmiştir. Bu değişikliklerden sonra farklı hücrelerdeki çeşitli hasarların belirlenmesi için uygun hale getirilmiştir [Collins, 2004; Speit ve Hartmann, 2005]. Bu test şimdilerde en iyi şekilde dizayn edilmiştir. Bireysel hücre popülasyonları içerisinde niteliksel olarak DNA hasar ve tamirinin değerlendirilmesi için basit, hızlı, duyarlı, görsel ve çok amaçlıdır [Olive ve Banath, 2001]. Komet testi ile DNA kroslink (timin dimeri vb.) ve oksidatif DNA hasarı gibi DNA hasarlarının diğer lezyonlarından bazıları, lezyona spesifik antikor veya spesifik DNA tamir enzimleri kullanılarak değerlendirme yapılabilmektedir. Komet testi; ileri DNA hasarı ve tamiri [Speit ve Hartmann, 2005] çalışmalarında, genotoksisite çalışmalarında [Moller, 2005] ve insan biyo-izlemelerinde [Kassie vd., 2000; Moller, 2006] güçlü bir araç olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Diğer genotoksisite testleriyle karşılaştırıldığında (kromozomal aberasyon, kardeş kromatid değişimi, mikronukleus testi) komet testinin avantajı DNA hasarının çok düşük miktarlarında bile duyarlılığa sahip olması, az sayıda hücrenin yeterli olması, çoğalan ve çoğalamayan hücrelerde kullanıma sahip olması, düşük fiyatlı olması, uygulamasının kolay olması ve çalışmanın kısa sürede tamamlanmasıdır. Oral ve nazal mukoza hücrelerinde mutajen ve karsinojenlerin ilk etkileştikleri hücrelerde mutajenite / karsinojenite belirlenebilmektedir. Tek hücre seviyesinde elde edilen veriler istatistiksel analizlerin güçlü tiplerine izin vermektedir.

Komet testi anojenik etkilerin belirlenmesinde sınırlı olarak kullanılmaktadır. Hücre siklusu kontrol noktalarını etkileyen DNA hasarının epigenetik mekanizmalarını ve karsinojenitenin muhtemel mekanizmasını belirleyememektedir. Tek hücre verileri, küçük hücre örnekleri, teknik çeşitlilik gibi

konular komet testinin diğer dezavantajlarıdır. Komet testi bu dezavantajlarına rağmen, moleküler epidemiyolojiden genetik toksikolojiye birçok kullanım alanına sahiptir.

Kuyruktaki DNA yüzdesi ve olive kuyruk momenti genotoksisite çalışmalarındaki korelasyonu vermektedir. Çoğu çalışmalar bu komet parametrelerini rapor etmektedir. Komet testinde kullanılan parametreler rutin kullanım için uygun olmalıdır. OTM, farklı resim analiz sistemlerinde verilen farklı değerler ve planlı olmayan ünitelerde haber edildiğinden bu yana kuyruktaki DNA yüzdesinin daha iyi bir parametre olduğu düşünülmektedir [Gedik ve Collins, 2005]. Şekil 2.3.'de kuyruk uzunluğuna göre komet tipleri gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kuyruk uzunluğuna göre komet tipleri(0: Tip 0, 1: Tip 1, 2: Tip 2, 3: Tip 3, 4: Tip 4) [Yeni vd., 2010].

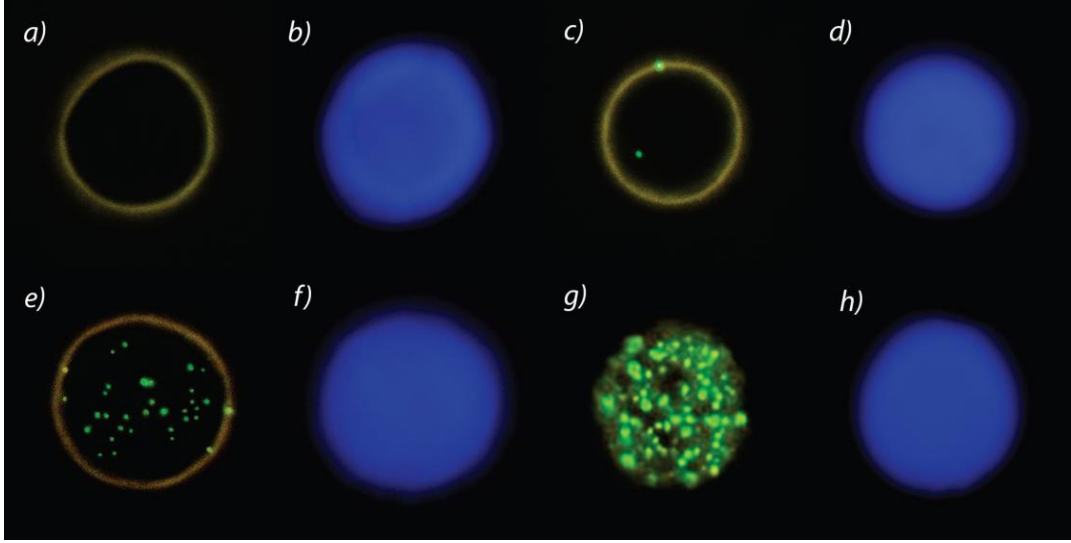
İn vivo komet testine ek olarak, *in vitro* komet testi için de prensip formüle edilmiştir [Tice vd., 2000; Hartmann vd., 2003]. Son yıllarda, komet testinde çalışma dizaynları ve veri analizlerinin ilişkisini değerlendirme, Uluslararası Genotoksisite Testi Çalışma Grubu (IWGT) tarafından tartışılmıştır. *İn vivo* komet testinin alkalın versiyonunda (pH<13) belirli uyarılar verilmiştir. Ulusal ajanslar tarafından kabul edilen standardize protokoller için tavsiyeler verilmiştir [Burlinson

vd., 2007]. Çalışmalarda kullanılan izole hücreler veya çekirdeğe ait verilerin yanlış yorumlanmasından kaçınmak için tek dozla yapılan çalışmalardansa çoklu dozlarla çalışılması gerektiği vurgulanmıştır. Apoptozis ve nekrozisin mekanizmasını önlemek için hücrelerin sitotoksitesisi test edilmiştir. Kometlerin sayısı, şekil analiz sistemlerine ek olarak manuel olarak ta değerlendirilmiştir. *İn vivo* komet testinin (*in vitro* versiyonlara ek olarak) doğruluğu ve güvenilirliğini değerlendirmek için etkili bir şekilde ulusal doğrulamaya ihtiyaç duyulmuştur. Böylece laboratuvar çalışmalarında çeşitlilik yükselmesini azaltmak amaçlanmıştır.

2.1.3.Gama H2AX Testi

H2A histon proteininin spesifik varyantı, H2A ailesinin üyesi X ya da H2AX, ilk olarak 1980 yılında West ve Bonner tarafından keşfedilmiştir. Bonner 1981 yılında Pantazis ile birlikte H2AX'in fosforillenebileceğini ve asetillenebileceğini göstermeye devam etmiştir [Watters vd., 2009]. Organizma ve hücre tipine bağlı olarak memeli histon H2A'nın %2-25'ini H2AX oluşturmaktadır. Çoğu diğer histon proteinlerde olduğu gibi, H2AX, N-terminal ve C terminal kuyruk bağlanmış merkezi globuler domainden oluşmaktadır. Bu yapı post translasyonel modifikasyonların çeşitliliğinden (asetilasyon, biotinilasyon, fosforilasyon, metilasyon ve ubikuinasyon) etkilenmektedir [Dickey vd., 2009].

H2AX, eşsiz COOH terminal kuyruğu ve C ucunda (omega 4) dört serin kalıntısı içermesi hariç diğer H2A türleri ile yapısal olarak benzemektedir. Motifi çevrelemenin yanı sıra serin kalıntılarının omega 4 pozisyonu, protozoa ve *Giardia intestinalis*'de yüksek derecede korunmuştur. DNA çift zincir kırıklarının varlığında, H2AX omega 4 serin kalıntısı hızlı bir şekilde gama H2AX'e formlanır [Dickey vd., 2009]. DNA çift zincir kırıklarının olduğu durumlarda nükleer ışın tarafından hasarlar görselleştirilmektedir. Bir H2AX ışınması bir çift zincir kırığına eşdeğerdir. Çift zincir kırıklarının 100'den daha az olması koşullarında dahi H2AX ışınması oluşmaktadır [Watters vd., 2009]. Şekil 2.4.'de gama H2AX ışınması gösteren lenfositlere ait görüntüler gösterilmiştir [Scarpato vd., 2013].

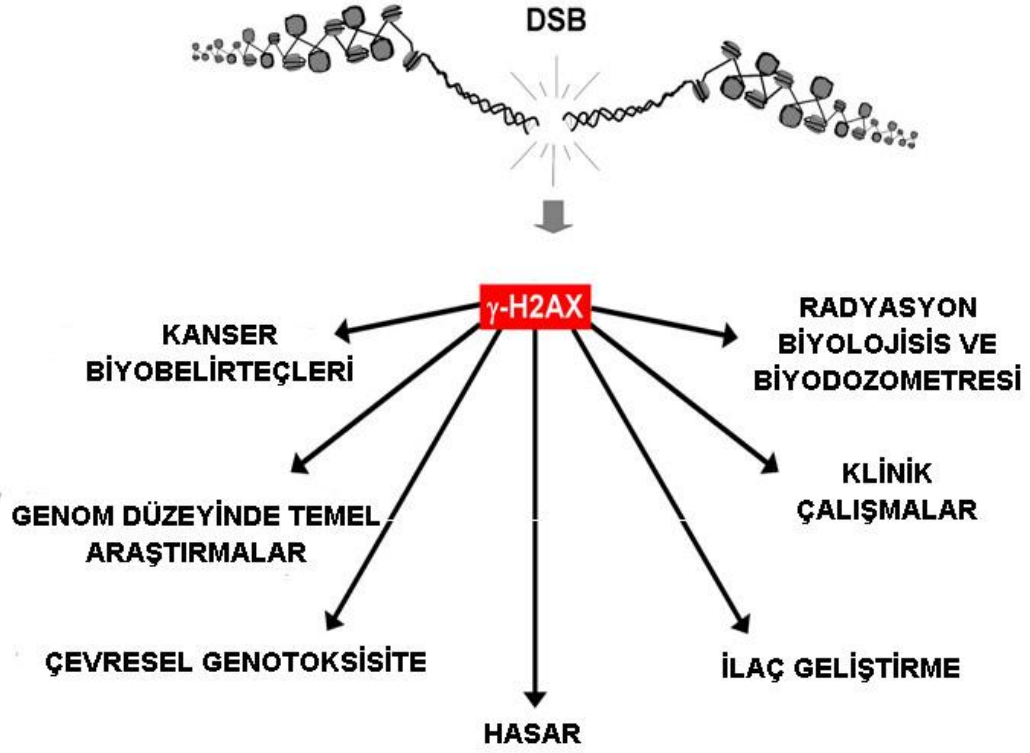


Şekil 2.4. İmmünofluoresan boyamadan sonra, insan periferel lenfositlerinde γ -H2AX ışınması DvLight 488 ile yeşil noktalar şeklinde görselleştirilmiştir.(a)Normal bir hücre: γ -H2AX ışınması göstermemiş. (b)Normal hücrenin DAPI ile boyanış hali (c) İki γ -H2AX ışınması gösteren hücre (d) İki ışınma veren hücrenin DAPI ile boyanmış hali (e) 30'dan fazla ışınma veren hasarlı hücre (f) Aynı hücrenin DAPI ile boyanmış hali (g) Sayılamayacak kadar fazla ışınma veren hasarlı hücre (h) Aynı hücrenin DAPI ile boyanmış hali [Scarpato vd., 2013].

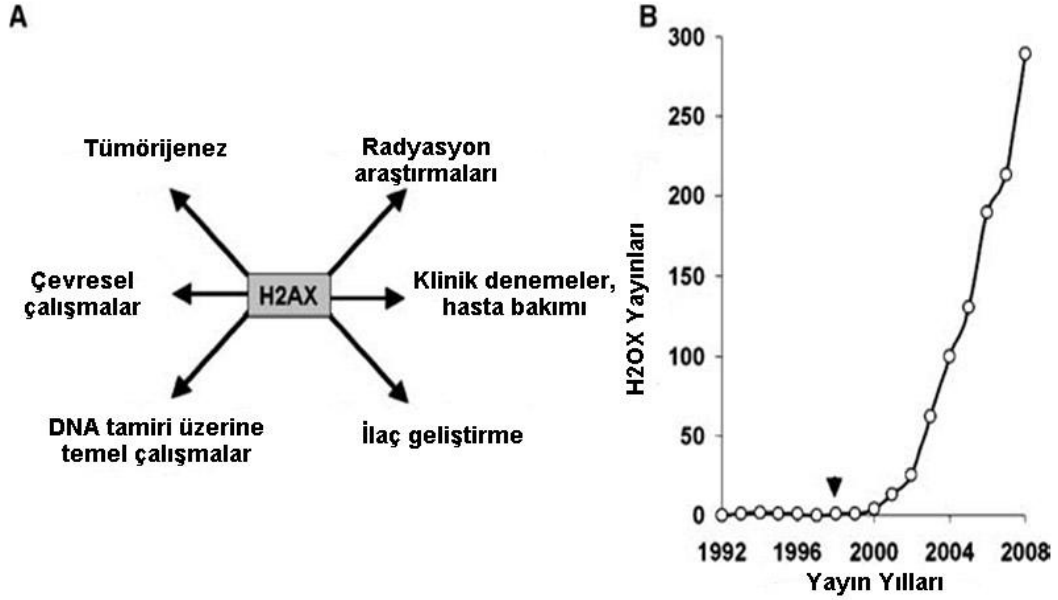
Gama H2AX ışınma analizi, hasar cevabında erken adımlardan biri olarak tanımlanmaktadır. Hasar cevabında histon proteinlerinden H2A varyantı olan H2AX'in fosforillenmesinden dolayı bu isimle anılmaktadır. H2AX fosforile olduğu zaman gama H2AX'i oluşturmaktadır. Fosforilasyon olayı çift zincir kırık alanındaki geniş mesafeyi daha da büyütmemektedir. Spesifik gama H2AX antikolar kullanıldığı zaman çift zincir kırıklar farklı ışınmalar şeklinde görselleştirilebilmektedir. Bu test yüksek derecede duyarlıdır ve tüm çift zincir kırıklarını belirleyebilmektedir. Bununla birlikte gama H2AX oluşumu tek zincir DNA bölgelerinde de (replikasyon veya tamir boyunca) meydana gelebilmektedir [Löbrich vd., 2010].

Diğer genotoksisite test sistemlerinin çeşitli alanlarda kullanımının yanında gama H2AX test sistemi de farklı alanlarda kullanılmaktadır. Radyasyon, ilaç ve diğer tedavilerin etkisini geliştirmek için terapötik markır olarak (Şekil 2.5), DNA çift zincir kırıklarının biyobelirteci olan gama H2AX iyi bir aday protein olabilmektedir. Genom bütünlüğünü ortaya çıkaran çalışmalarda H2AX testinin kullanımını gün geçtikçe yükselmektedir. Ek olarak, temel araştırma çalışmalarında,

H2AX şimdilerde ilaç geliştirme ve translasyonel çalışmalarda kullanılmaktadır. Hücrelerde yüksek duyarlılıktaki antikolarla gama H2AX'in varlığı ilk olarak Bonner ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Hem H2AX hem de gama H2AX antikoları ticari olarak elde edilebilmektedir (Çizelge 2.1.). Gama H2AX testi, darbeli alan jel elektroforezi ve komet testi gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında DNA hasarının miktarının ölçülmesinde daha etkili ve duyarlı olmuştur. Çoklu DNA hasar ajanlarına maruziyetten sonra gama H2AX'in oluşumu; immünofloresan, flow sitometri veya western blotlama ile ölçülebilmektedir. İyonize radyasyon, X ışınları, gama radyasyon, alfa partiküller ve ağır iyon maruziyeti hücrel DNA'da direk çift zincir kırığı başlatabilmektedir. Ek olarak sitotoksik ajanlarla hücrelerin muamelesi (DNA alkilleyici ajanlar, topoizomeraz I ve II inhibitörleri, bleomisin, hidrojen peroksit), gama H2AX oluşumuna neden olan çift zincir kırık oluşumunu başlatabilmektedir [Dickey vd., 2009]. İyonize radyasyonun etkilerinin değerlendirilmesinde ve kanser terapilerinde gama H2AX'in kullanımı yaygındır. Gama H2AX radyoterapi etkilerinin değerlendirilmesinde mükemmel bir hedeftir. Endojen ve eksojenlerin meydana getirdiği DNA hasarının gözlemlenmesinde de gama H2AX testi yaygın olarak kullanılmaktadır [Kuo ve Yang, 2008; Redon vd., 2009]. DNA çift zincir kırıklarının ortaya çıkarılmasında gama H2AX'in duyarlılığı ve kullanışlılığından dolayı, gama H2AX son yıllarda klinik uygulamalarda kullanışlı biyomarkırlar olarak tanımlanmaktadır. Doku ve hücrel örneklerde gama H2AX'in ortaya çıkarılması için detaylı protokoller Elsewhere'de yayınlanmıştır [Dickey vd., 2009].



Şekil 2.5. Gama H2AX ortaya çıkaran uygulamalar [Redon vd., 2011].



Şekil 2.6. A) Gam H2AX'in biyo belirteç olarak kullanıldığı alanlar

B) Yıllara göre gama H2AX yayınının sayısındaki artış. [Dickey vd., 2009]

Çizelge 2.1. İnsan H2AX, γ -H2AX antikorları ve peptidlerinin ticari olarak ulaşılabilirliği [Dickey vd., 2009].

Şirket	Konum	H2AX Antikoru	Gama H2AX Antikoru	Peptid
Abcam Inc.	Cambridge, MA	T	F T	H2AX ve γ
AbD Serotec	Raleigh, NC	T		
Abgent	San Diego, CA		F	
Abnova Corp.	Taipei, Taiwan	F	T	rH2AX
ABR Affinity Bioreagents Inc.	Golden, CO	T	F T	
Acris Antibodies, GmbH	Hiddenhausen, Germany	F T	FT	rH2AX
Active motif	Carlsbad, CA		T	
Assay Designs/Stressgen Bioreagents Inc.	Ann Arbor, MI		F T	rH2AX
Bethyl Laboratories Inc.	Montgomery, TX	T	T	H2AX ve γ
Biolegend	San Diego, CA	T	F	
Biovision Inc.	Mountain View, CA	T		
Calbiochem	San Diego, CA	T	T	
Cell Sciences	Canton, MA		T	
Cell Signaling Tech. Inc.	Danvers, MA	T	T	γ
Epitomics, Inc.	Burlingame, CA		T	
GeneTex Inc.	San Antonio, TX	F T	F T	
Gen Way biotech, Inc.	San Diego, CA	T	T	
Hycult Biotechnology	Uden, The Netherlands		T	

‘Çizelge 2.1. (devamı)’

LifeSpan Biosciences Inc.	Seattle, WA	F T	F T	
MBL international	Woburn, MA	T	T	
Millipore	Billerica, MA	T	F	rH2AX
Novus Biological Inc.	Littleton, CO	F T	F T	rH2AX
OriGene, Inc.	Rockville, MD		T	
Proteintech Group Inc.	Chicago, IL	T		
Raybiotech, Inc.	Norcross, GA	T		
R&D Systems	Minneapolis, MN	F	T	
Santa Cruz Biotechnologies Inc.	Santa Cruz, CA	K	T	
Sigma-Aldrich Co	St. Louis, MO	F	T	
Signalway Antibody	Pearland, TX	T	T	γ
Trevigen Inc.	Gaithersburg, MD		T	

(T): Tavşan, (F): Fare, (K): Keçi poliklonal, γ : γ H2AX peptidi, rH2AX: Rekombinant H2A

2.2.GENETİK TOKSİKOLOJİ TESTLERİNDE İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜ

Çevresel kirleticilerin canlılar üzerine etkilerini değerlendirmek önemlidir. Fakat her zaman canlı doğrudan kullanılamayabilir. Örneğin insanlar çevredeki birçok kirleticie bazen doğrudan bazen de dolaylı olarak maruz kalmaktadır. Ancak insanları doğrudan deney materyali olarak kullanmak etik açıdan uygun değildir. *İn vivo* ve *in situ* çalışmalar ise zaman almaktadır. Bu nedenle *in vitro* çalışma ortamları kullanılmaktadır. Son yıllarda *in vitro* ortamda çeşitli doku kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalarda artış olmuştur. İnsan lenfosit kültürüyle yapılan sitogenetik ve genotoksisite değerlendirme çalışmaları da bu çalışmalar arasında yer almaktadır.

In vitro çalışmalarda en yaygın kullanılan hücrelerden biri de lenfositlerdir. Lenfositlerin elde edilmesi kolaydır ve verici açısından zor değildir. Genotoksisite çalışmalarında da lenfositlerin güvenilir ve uygun olduğu bir çok çalışma ile desteklenmektedir. Bu nedenle bizim çalışmamızda da lenfosit kültürü kullanılmıştır.

2.3. PESTİSİTLER

Tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini arttırmak için modern tarım tekniklerinin ve girdilerinin kullanılması gerekmektedir. Bitki koruma ürünleri içerisinde yer alan pestisit kullanımı da bu girdilerden biridir ve modern tarımın tamamlayıcı bir bileşendir. Pestisit kullanımı, tarımsal ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararından koruyabilmek, kaliteli üretimi güvence altına alabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup, 1940'lı yıllardan beri üretimi arttıran en önemli bileşendir. Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir [Tiryaki vd., 2010].

Pestisitler değişik özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz:

Etkiledikleri Canlı Gruplarına Göre; insektisit (Böcekleri öldüren), akarisit (Akarları öldüren), nematisit (Nemotodları öldüren), mollusisit (Yumuşakçaları öldüren), rodentisit (Kemirgenleri öldüren), avisit (Kuşları öldüren), afisit (Yaprak bitlerini öldüren), fungusit (Fungusları öldüren), bakterisit (Bakterileri öldüren), herbisit (Otları öldüren) ve algisitlerdir (Algleri öldüren).

Etkilediği Canlının Biyolojik Dönemine Göre; larvasit (Larva öldüren), ovisit (Yumurta öldüren) ve erginleri öldürenlerdir.

Zararlılara Etki Yollarına Göre; mide zehirlileri, değme (Kontakt) zehirliler ve solunum zehirlileridir.

Toksik Özelliklerine Göre; fiziksel zehirliler, protoplazma zehirlileri, sinir sistemi zehirlileri, solunum zehirlileri ve antikoagulantlardır.

Kullanma Tekniğine Göre; doğrudan kullanılanlar ve su veya bir başka çözücü ile seyreltilerek kullanılanlardır.

Etkili Madde Gruplarına Göre; canlı kökenli olanlar (mikroorganizma kökenliler), anorganik yapıda olanlar, doğal organik yapıda olanlar, bitkisel kökenli olanlar, petrol yağları, katran yağları, sentetik organik yapıda olanlar, klorlandırılmış hidrokarbonlar, organik fosforlar, karbamatlılar, sentetik piretroitler, benzoyl türevleri, dinitro bileşikler, amin ve hidrazin türevleri, dinitrofenol ve esterleri, halojen ve oksijenler ve organik kalaylılardır [Erişim:<http://www.ziraattube.com/m/331/pestisitlerin-siniflandirilmesi.html>].

Bizim çalışmamızda kullandığımız spirotetramat insektisidi, insektisitlerin yeni bir grubu olan tetramik asit grubuna ait bir insektisittir [EPA spirotetramat 2008].

Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlar olarak tanımlanmaktadır. Pestisitler, kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, antimikrobiyal etkili bir bileşen, dezenfektan ya da herhangi bir araç olabilmektedirler [Erişim: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Pestisit>] Pestisitlerin gerek çevre, gerek sağlık ve gerekse ekonomik açıdan getirebilecekleri olumsuzluklar gelişmiş ülkelerde gayet iyi bilinmektedir. Bunun için, başta AB olmak üzere, tüm gelişmiş ülkelerde tüketilecek tarım ürünleri, çevre ve sağlık açısından sürekli denetlenmektedir. Türkiye’de pestisit tüketimi etken madde olarak 2002 yılında, 1979 yılına oranla % 45,29’luk bir artış göstermiştir. Bu artış oranı gelişmiş ülkelere göre daha düşük olmasına rağmen, birim alanda kullanılan pestisit miktarının küçümsenmeyecek kadar önemli olduğu görülmektedir [Delen vd., 2005] (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Türkiye’de yıllara göre pestisit tüketimi (kg veya L) [Delen vd., 2005].

Pestisit Grupları	1979	1987	1994	1996	2002
İnsektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991	3.027.380	2.250.898
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588	3.643.971	3.697.397
Yağlar	1.594.526	2.147.106	2.147.106	2.871.160	2.428.238
Fungisitler	1.537.315	2.611.960	2.201.406	2.951.191	1.964.292
Nematisitler	315.665	322.227	530.738	1.076.661	1.559.489
Akarisitler	203.107	240.360	192.279	223.857	296.809
Rodentisit	5.600	2.124	2.509	3.268	1.794
TOPLAM	8.395.848	12.112.267	10.871.792	13.797.488	12.198.917

Buna rağmen Türkiye’de yoğun bir şekilde modern tarım yapılmaktadır. Türkiye’de modern tarımın en çok yapıldığı bölgelerin başında ise Akdeniz ve Ege bölgeleri gelmektedir. Bu bölgelerdeki pestisit tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir (Çizelge 2.3.). Bu bölgelerde tüketilen pestisitler özellikle çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadırlar. Verilere bakıldığında insektisitler, herbisitlerden sonra en çok tüketilen pestisitlerdir [Delen vd., 2005].

Çizelge 2.3. Ege ve Akdeniz Bölgeleri ile Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinin Türkiye pestisit tüketimindeki preparat olarak payları [Delen vd., 2005].

Bölgeler	Yıllar ve bölgelerin payları (%)				
	1994	1995	1996	1997	1998
Ege	19,37	19,04	15,51	18,56	17,10
Akdeniz	21,30	25,47	26,36	15,77	24,92
Doğu Anadolu	2,92	2,61	3,71	3,90	4,86
Güney Doğu Anadolu	8,70	6,93	7,58	6,64	7,10

2.3.1. Pestisitlerin Genotoksik Etkileri

Pestisitler doğrudan hedef organizmayı etkileyecek şekilde üretilirler. Fakat bu durum her zaman başarılı olmayabilir. Pestisitler uygulandıkları ortamda hedef olmayan canlılarda ters etkiler yaratabilir. Aynı zamanda, çoğu pestisit insanlarda da toksik risk yaratabilir [Bolognesi 2003].

Çevrede gerek karasal ortamda gerekse sucul ortamda pestisitlerin değişen konsantrasyonlarına hedef organizmalarla birlikte hedef olmayan organizmalar da maruz kalmaktadır. Canlıların maruz kaldığı konsantrasyonlara ve canlı türüne bağlı olarak her pestisitinin etkisi farklılık göstermektedir. Genelde pestisitlerin canlı üzerindeki etkisi direkt akut olmamakla birlikte zamana bağlı olarak birikim sonucu toksik, genotoksik veya kanserojen olabilmektedir [Kocataş, 1991].

USA'da pestisit olarak kayıtlı 890 aktif bileşen bulunmaktadır. Bugünlerde ise marketlerde 20.700 pestisit ürünü raflarda yerini almış durumdadır. Bu bileşenlerin çoğu onların çevredeki dirençliliğinden dolayı, uzun yıllar çevremizdeki varlıklarını sürdürmektedirler. Çevresel kontaminasyon veya mesleki kullanımdan dolayı tüm insanların pestisit maruziyeti kaçınılmazdır. Populasyonlar hava, su ve yiyecekler aracılığı ile pestisitlere, degradasyon ürünlerine ve kalıntılara maruz kalmaktadırlar. Gelişen dünyada kendi kendini zehirleme esnasında en çok kullanılan

araçlar pestisitlerdir. Dünya çapında her yıl 3 milyon pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte ve hemen hemen 220.000'i ölümcül olmaktadır [Bolognesi 2003].

Pestisitlere ilk olarak uygulama sırasında insanlar maruz kalmaktadır. Bu maruziyete gıdalardaki kalıntılar eklenmekte ve kişilerin maruz kaldığı pestisit miktarı katlanarak artmaktadır. Bu nedenlerden dolayı farklı pestisitlerin genotoksitesinin değerlendirilmesi in vitro lenfosit kültürü kullanılarak yaygın şekilde gerçekleştirilmektedir. İnsanlarda gerçekleştirilen pestisit genotoksite çalışmaları Çizelge 2.4.'de verilmiştir [Bolognesi 2003].



Çizelge 2.4. Pestisit maruz kalan insanlarda gerçekleştirilen sitogenetik çalışmalar [Bolognesi 2003].

Çalışılan Nesne Maruziyet/Kontrol	Maruz Kalınan Bileşen	Maruziyet Süresi(yıl)	Gerçekleştirilen Analiz	Sonuç	Referans
Dikim işçilerinin kimyasal/pestisit maruziyetinin insan popülasyonlarındaki sitogenetik etkisi					
44/30	Novozir Mn80 (mankozeb içeren fungusit)	> 2	CA SCE	Pozitif(+1.83) Pozitif(+1.17)	Jablonika vd., 1989.
14/50 9 karışımıcı, 5 paketçi	Azinfos metil, dimetoat, malation, metil paration	N.D.	SCE	Pozitif(+1.21)	Laurent vd., 1996.
19/36	2,4,5-T, 2,4-D	10-30	CA	Pozitif(+2.05)	Kaioumova ve Khabutdinov, 1998.
20/20	Pestisit karışımı;en yoğun kullanılan pestisitler: 2,4-D, atrazin, alaklor, siyanazin, malation	4-30(8 aylık yüksek maruziyetten sonra örnek taşıma)	CA MN	Pozitif(+6.10) Pozitif(+3.63)	Garaj-Vrhovac ve Zeljezic, 1999,2001. Zeljezic vd., 2001, 2002.
20/20			SCE	Pozitif(+2.23)	Zeljezic ve Garaj-Vrhovac, 2002.
135/111	Organofosfatlar	1-24	SCE	Pozitif(+1.85 sigara kullanan) (+1.63 sigara kullanmayan)	Padmavathi vd., 2000.
Pestisit uygulayıcılarında pestisit maruziyetinin insan popülasyonundaki sitogenetik etkisi					
Tek pestisit maruziyeti					
35/15	Orman işçileri:2,4-D,MCPA Sprey öncesi Spreyleme boyunca Spreyden sonra	ND	SCE	Negatif Negatif Negatif	Linnainmaa, 1983.

‘Çizelge 2.4. (devamı)’

19/15	Orman işçileri:2,4-D,MCPA; Sprey sezonundan sonra	6-28gün	CA	Negatif	Mustonen vd., 1986.
60/42	Papaya işçileri:etilen dibromid	5 ortalama	CA SCE	Negatif Negatif	Steenland vd., 1986.
24/24	Dezenfekte uygulayıcıları(açık alan):fosfin ve diğer pestisitler	Fosfinin kesikli kullanımı, 8 aydan daha az kullanım	CA	Pozitif (+3.58)	Garry vd., 1989.
18/26	Dezenfekte uygulayıcıları(açık alan):fosfin ve diğer pestisitler	Fosfinin kesikli kullanımı, 8 aydan daha az kullanım	CA	Pozitif (+3.4)	Garry vd., 1992.
31/21	Dezenfekteci:Fosfin	ND	MN	Negatif	Barbosa ve bonin, 1994.
38/16	Medfili imha programı: malation	Spreyleme sezonundan sonra	MN	Negatif	Titenko-Holland vd.,1997.
31/30	Etilenbis (ditiokarbamat) fungusit spreycileri	ND	CA	Pozitif(+1.32)	Steenland vd., 1997.
13/30	Domates işçileri	ND	CA	Negatif	
31/30	Fungusit spreycileri	ND	SCE	Pozitif(+1.12)	Steenland vd.,1997.
31/27	Dezenfekte uygulayıcıları:metilbromid	0.3-22	MN	Negatif	Calvert vd., 1998.
12/9	Pestisit uygulayıcıları:2,4-D	Kesikli kullanım	MN	Negatif	Figgs vd., 2000.
Pestisit karışımına maruziyet					
109/57	Veri yok	2-20	CA	Pozitif (+1.68)	Nehez vd., 1981.
80/24	Pestisit karışımı(80	1>15	CA	Pozitif (+2.69 dan	Paldy vd., 1987.

'Çizelge 2.4. (devamı)'

	formülasyon):karbamat, ditiokarbamat,heterosiklik bileşenler, nitro bileşenler, organoklorinler, fenoksi asetik asit, fitalimidler, pretroidler, sülfür ve bakır içeren kimyasallar			+3.89)	
15/10	Bağ işçileri: bakır sülfat,DDT, diklorvos, dieldrin, ditan, lindan, metasistoks, paratyon, kuinalfos	5-12	CA	Pozitif(+4.16)	Rita vd., 1987.
55/60	Sera işçileri:pestisit karışımı, insektisitler(karbamatlar,org anofosfatlar); piretroid fungusitler, akarisitler	2-15	CA	Pozitif(+1.18-1.52)	Nehez vd., 1988.
25/30	Sebze bahçesindeki işçiler: BHC,DDT,dimetoat, fenitroton, gromor, malation, paration, ure	5-38	CA SCE	Pozitif (+1.72-2.08) Pozitif (+1.43-1.64)	Rupa vd., 1988.
52/25(erkek sigara kullanmayan)	Pamuk tarlasındaki işçiler:BHC, DDT, sipermetrin, dimetoat, endosülfan, fenvalerat, malation, metil paration, monocrotopos, fosfamidon, kuinolfos	1-25	CA	Pozitif (+3.32-6.51)	Rupa vd., 1989.
50/47(erkek sigara kullanan)	Pamuk tarlasındaki işçiler:BHC, DDT,	1-25	CA	Pozitif(+2.01-2.12)	Rupa vd., 1989.

'Çizelge 2.4. (devamı)'

	sipermetrin, dimetoat, endosülfan, fenvalerat, malathion, metil paration, monocrotopos, fosfamidon, kuinolfos		SCE	Pozitif((+1.32-1.88)	Rupa vd., 1989.
26/26 (erkek sigara kullanmayan)	Pamuk tarımcıları: sipermetrin, dimetoat, endosulfan, fenvalerat, malation, metil paration, monokrotofos, fosfamidon, kuinolfos	2-18	CA	Pozitif(+3.61)	Rupa vd., 1991.
61/45(erkek sigara kullanmayan)		2>20	SCE	Pozitif(+2.36)	Rupa vd.,1991.
29/14	Sera işçileri: karbamat, ditiokarbamat,organoklorinler, organofosfatlar	4-30	CA	Pozitif(+4.42)	Kourakis vd., 1992.
56/30	Domates, kabak yetiştiricileri: organofosfatlar, karbamatlar,ditiokarbamatlar ,organoklorinler	6	CA	Pozitif(+5.01)	Kourakis vd., 1996.
29/30	Seralar			Pozitif(+6.35)	
27/30	Açık alanlar		SCE	Pozitif(+3.54) Negatif	
7/6	Açık alan : pestisit karışımı, sipermetrin, deltametrin	3-38	CA	Pozitif(+2.81)	Mohammad vd., 1995.
134/157	Seralardaki yetiştiriciler:pestisit karışımı-	1-50	SCE		Lander ve Ronne, 1995.

'Çizelge 2.4. (devamı)'

	benzimidazoliks, karbamatlar, organofosfatlar, poliklorinler, piretroidler, tiofitalimidler Sigara Kullananlar			Negatif	
	Sigara Kullanmayanlar			Pozitif(+1.12)	
48/50	Çiftçiler(tahıl, meyve, sebze):pestisit karışımı;en yaygın kullanılan pestisitler:alaklor, atrazin, benomil, karbaril, deltametrin, dinokap, linuron, mancozeb, MCPA, metobromuron, metolaklor, oksadiksil, oksifluorfen, propineb, triadimenol.	4-50	SCE MN	Negatif Pozitif(+1.20)	Pasquini vd., 1996.
27/20	Bağ işçileri:pestisit karışımı;en yaygın kullanılan pestisitler:2,4-D, desmedifam, diazinon, ditiokarbamat,etofumesat, metalaksil+Cu, fenmedifan, propiconazol, triadimefon, vinklozolin	12,1;spreyl eme sonunda, sezonda	CA SCE MN	Pozitif (+15.8) Negatif Pozitif(+7.67)	Joksic vd., 1997.

Nagy ve arkadaşları [2014], tarımsal alanda ve evlerdeki böceklerin kontrolünde geniş çapta kullanılan sentetik piretroid bir bileşen olan fenotrinin genotoksitesini insan periferik kan lenfosit kültüründe komet testini kullanarak araştırmışlardır.

Timoroglu ve arkadaşları [2014], organofosforlu insektisitlerden forat ve triklorfonun *in vitro* genotoksik etkilerini dört genotoksikite testi kullanarak değerlendirmişlerdir. Test sistemlerinden kromozom aberasyonu, kardeş kromatit değişimi, mikronukleus ve komet testlerini kullanmışlardır.

Çavaş ve arkadaşları [2012], neonicotinoid insektisitlerin üyesi olan asetamipridin genotoksik etkisini *in vitro* ortamda mikronukleus, komet ve gama H2AX test yöntemini kullanarak araştırmışlardır.

Sandal ve Yılmaz [2011], çevrede kirliliğe neden olan ve insan sağlığını tehdit eden farklı pestisitlerin genotoksik etkilerini sigara kullanan ve kullanmayan insanların lenfosit kültüründe komet testini yaparak araştırmışlardır.

Özkan ve arkadaşları [2009], organofosforlu insektisitlerden aseptatin genotoksik etkilerini insan lenfosit kültüründe araştırmışlardır. Araştırmalarında kromozom aberasyon, kardeş kromatit değişim, mikronukleus ve komet testlerini kullanmışlardır.

Çelik ve arkadaşları [2014], fenilpirazol pestisitlerden fipronil'in genotoksitesini kardeş kromatit değişimi, komet testi ve mikronukleus testini kullanarak *in vitro* lenfosit kültüründe değerlendirmişlerdir.

Benedetti ve arkadaşları [2013], fasulye yetiştiriciliği yapan işçilerde pestisit maruziyetinin meydana getirdiği genotoksik hasarı işçilerin periferik lökositlerinde komet testi, bukkal epitellerinde ise mikronukleus testi ile belirlemişlerdir.

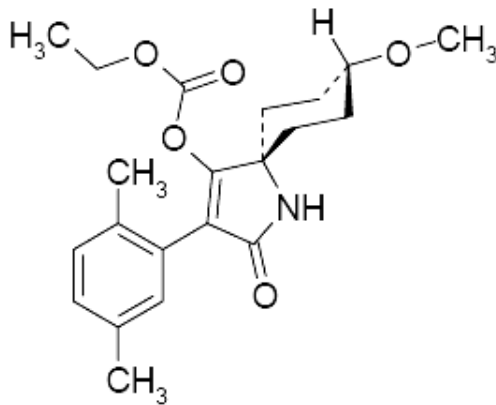
Xiang ve arkadaşları [2013], karbamatlı insektisitlerden metomil'in genotoksik etkilerini mikronukleus, kromozom aberasyonu, kardeş kromatit değişimi, komet testi ve gama H2AX testi ile farklı hücre hatlarında değerlendirmişlerdir.

Dwivedi ve arkadaşları [2012]; pirinç, çay, buğday ve diğer ürünlerde geniş kullanım alanına sahip sistemik bir herbisit olan butaklor'un genotoksik potansiyelini insan periferel kan monositlerinde komet testini kullanarak değerlendirmişlerdir.

Kocaman ve Topaktaş [2009], yüksek derecede aktif piretroid insektisit olan alfa sipermetrinin genotoksitesini insan periferel lenfositlerinde kardeş kromatit değişimi, kromozom aberasyonu ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlardır.

2.3.2.Spirotetramat

Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, zararlarını azaltmak veya kontrol altına almak amacıyla kullanılan bileşiklerdir. Bu gruptaki bileşikler içinde yer alan ve böceklere karşı kullanılan insektisitler, küresel anlamda daha çok, tarımsal üretimi artırmak amacıyla kullanılan ürünler olarak bilindikleri için birçok yerde "tarım ilacı" olarak da adlandırılmaktadırlar [Özkaya vd., 2013]. Spirotetramat dünya çapında beyaz sineklere, afidlere, kırmızı örümceklere ve tarımsal alandaki diğer emici böceklerden korunmak için ürünlere yönelik olarak son yıllarda üretilmiş yeni siklik ketoenol bileşeni ve tetramik asit türevi bir insektisittir [Marcic vd., 2012]. Moleküler formülü $C_{21}H_{27}NO_5$ olan spirotetramatın kimyasal formülü Şekil 2.7.'de gösterilmiştir [EPA Spirotetramat, 2008].



Şekil 2.7. Spirotetramat'ın kimyasal yapısı [EPA Spirotetramat, 2008].

Çizelge 2.5. Test Bileşeninin Terminolojisi [EPA Spirotetramat, 2008].

Ticari Adı	Spirotetramat																
Kimyasal Sınıfı	Tetramik Asit Türevi (Ketoenol)																
Pestisit Tipi	İnsektisit																
CAS Numarası	382608-10-8																
CAS Adı	<i>cis</i> -3-(2,5-dimetilfenil)-8-metoksi-2-oxo-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-4-yl etil karbonat																
Erime Isısı (°C)	142																
Sudaki Çözünürlük (20°C)	pH 4 - 33.5 mg/L pH 7 - 29.9 mg/L pH9 - 19.1 mg/L																
Organik Çözücülerdeki Çözünürlük (20°C)	<table><thead><tr><th>Çözücü</th><th>g/L</th></tr></thead><tbody><tr><td>n-hekzan</td><td>0.055</td></tr><tr><td>Diklorometan</td><td>>600</td></tr><tr><td>Dimetil Sülfoksit</td><td>200-300</td></tr><tr><td>Toluen</td><td>60</td></tr><tr><td>Aseton</td><td>100-120</td></tr><tr><td>Etil asetat</td><td>67</td></tr><tr><td>Etanol</td><td>44</td></tr></tbody></table>	Çözücü	g/L	n-hekzan	0.055	Diklorometan	>600	Dimetil Sülfoksit	200-300	Toluen	60	Aseton	100-120	Etil asetat	67	Etanol	44
Çözücü	g/L																
n-hekzan	0.055																
Diklorometan	>600																
Dimetil Sülfoksit	200-300																
Toluen	60																
Aseton	100-120																
Etil asetat	67																
Etanol	44																

2.3.2.1. Spirotetramatın Genotoksik Etkileri

Spirotetramat'a ağız, deri ve solunum yoluyla maruz kalındığında düşük akut toksisite göstermiştir (Toksosite kategorisi 3 veya 4). Spirotetramat deride iltihaplanmaya neden olmamıştır (Toksosite kategorisi 4), aksine gözlerde iritasyona neden olmuştur (Toksosite kategorisi 2). İnsanlarda ve hayvanlarda ise deride potansiyel duyarlılığa rastlanmıştır [EPA Spirotetramat, 2008].

Spirotetramat'ın genotoksitesine dair insan lenfosit kültüründe yapılmış herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız literatürdeki bu açığı kapatacaktır. Buna rağmen spirotetramat'ın toksisite ve

genotoksitesine dair farklı canlılar üzerinde gerçekleştirilmiş çalışmalar bulunmaktadır.

Buğday köklerinde *Heterodera avenae* üremesine yapraktan uygulanan spirotetramat'ın etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonrasında spirotetramatın juvenillerde %35 azalma meydana getirdiği gözlenmiştir. Hektara 110gr şeklindeki uygulamalarda ise juvenil yumurtaların sayısı %78 azalmıştır [Smiley vd., 2011].

Spirodiclofen dirençliliği, narenciye kırmızı akarının duyarlı bir ırkı olan *Panonychus citri*'de laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 42 jenerasyon boyunca *Panonychus citri*'nin spirodiclofene karşı dirençli olduğunu göstermiştir [Yu vd., 2011].

Belçika'da lahanalara zarar veren afidlerden biri olan *Episyrphus balteatus*'un larvaları üzerine spirotetramat'ın etkileri laboratuvar ortamında araştırılmıştır. Sonuç olarak afid kontrolünde özellikle larval dönemde spirotetramat'ın çok etkili olduğu gözlemlenmiştir [Moens vd., 2011].

Çin narenciye bahçelerinden toplanan *Panonychus citri*'de spirodiclofen dirençliliği araştırılmıştır. Narenciye kırmızı böceği *Panonychus citri*, Çin'de pestisite en dirençli böceklerden biridir. Sonuçlar yetişkinlerde spirotetramat toksisitesinin düşük olduğunu göstermiştir [Hu vd., 2010].

Agbohessi ve arkadaşları [2013], batı Afrika'da Benin bölgesinde pamuk tarlalarında kullanılan pestisitlerin risk değerlendirmesini Afrika kedi balığı *Clarias gariepinus*'un embriyo-larva ve juvenillerinde değerlendirmişlerdir. Aktif bileşeni endosulfan olan Thionex 350 EC ve aktif bileşenleri flubendiamide ve spirotetramat olan Tihan 175 O-TEQ'nun akut toksisitesini araştırmışlardır.

Wu ve arkadaşları [2014], Çin kara kurbağası *Bufo bufo gargarizans*'ta akut toksisitenin etkilerini ve spirotetramat'a maruziyetin belirteci olarak lipit peroksidasyon parametrelerini ve antioksidantların potansiyel etkilerini değerlendirmişlerdir.

HPLC-MS metodu ile spirotetramat ve metaboliti spirotetramat enolün bitkilerdeki analizi gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmeler mango ve lahana

bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bitkilerdeki metabolit oranının spirotetramattan daha yüksek olduğunu göstermiştir. Yine aynı bitkinin farklı kısımlarındaki kalıntı miktarı da farklılık göstermiştir [Mohapatra vd., 2012].

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda da görüldüğü üzere spirotetramatin sadece hedef organizmalar üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar mevcuttur ve sınırlı sayıdadır. Fakat bu kimyasalın direkt hedefi olmayan diğer organizmalar üzerindeki toksisitesine dair çalışmaya “web of science” veri tabanında rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız önem arz etmektedir.

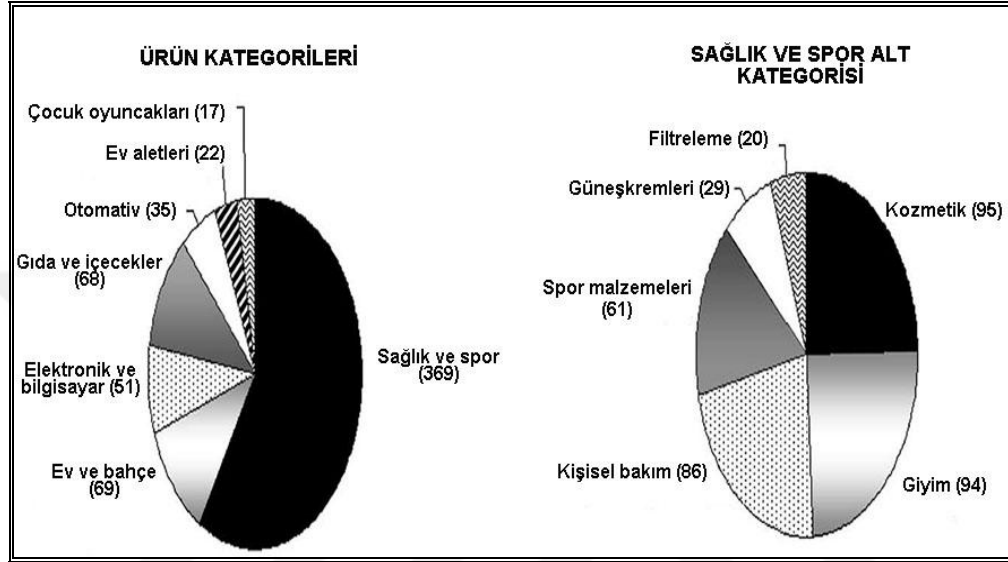
2.4. NANOPARTİKÜLLER

Endüstriyel nanopartiküller 1 ile 100nm arasındaki karakteristik büyüklüğe sahip ve eşsiz fizikokimyasal özellikler içeren, isteyerek üretilmiş partiküller olarak tanımlanırlar. Yüksek yüzey alanı, yüzeydeki bol reaktif alan, atomların geniş fraksiyonu gibi eşsiz özellikler bunları alışılmamış materyaller yapar. Endüstriyel nanopartiküller şimdilerde plastik eşyalarda, elbiselerde, kozmetikte, boyalarda, elektrik uygulamalarda, yiyecek ürünlerde yüksek oranda kullanılmaktadır. Ayrıca nanopartiküllerin uygulamaları biyomedikal alanda, sağlıkta, medikal görüntüleme ve tanı, yara bezleri, farmasötikler, ilaç gelişimi ve terapide yoğun şekilde kullanılmaktadır (Şekil 2.8.) [Singh vd., 2009]. Endüstriyel nanopartiküllere olan talep giderek artmaktadır ve 2015 yılında ticaret hacminin 1 trilyon Amerikan (US) dolarını aşacağı tahmin edilmektedir [Kumar ve Dhawan, 2013].

Nanomateriyaller 1 mikro metreden daha küçük fiber yada partikül olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenledir ki; nanomateriyaller insanlar tarafından solunabilir ve onların geometrisi, kompozisyonu, büyüklüğü, vücuda taşınımı insan sağlığında zıt etkilere neden olabilir. Bu partiküller özellikle yüksek konsantrasyonda bulunduğu olumsuz etkiler gösterebilmektedir [Hillegass vd., 2010].

Nanoteknolojinin ilerlemesi ile birlikte, nanomateriyallerin sağlık üzerine etkileri hakkındaki kaygılar bu materyallerin yoğun olarak kullanıldığı sektörlerin çalışanlarında ve tüketicilerde artmıştır. Bu nedenle, fiziksel ve kimyasal olarak farklı elementlerin sayısının değerlendirilmesi gerekmektedir. Nanomateriyallerin patojenitesi ve toksisitesini önlemek için kemiricilerin kullanıldığı modeller, zaman

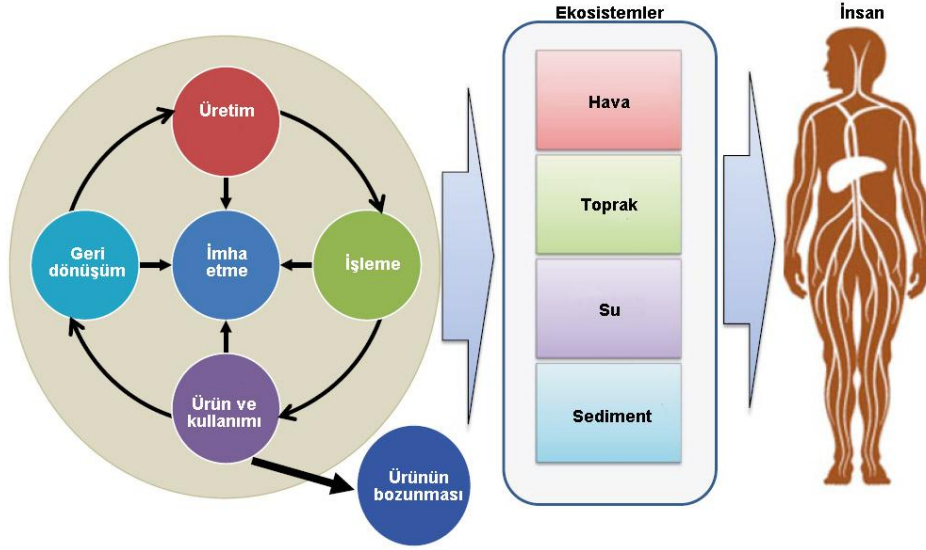
ve maliyetin yüksek olması bakımından kullanışlı değildir. Bundan dolayı, *in vitro* testlerin kullanılması daha elverişlidir. *In vitro* testler; sitotoksikite (metabolizma değişikliği, büyümede azalma, litik ve apoptotik hücre ölümü), proliferasyon, genotoksikite ve gen ekspresyon değişiklikleri için hücre kültür testlerini içerir [Hillegass vd., 2010].



Şekil 2.8. Nanopartiküllerin uygulama alanları [Singh vd., 2009].

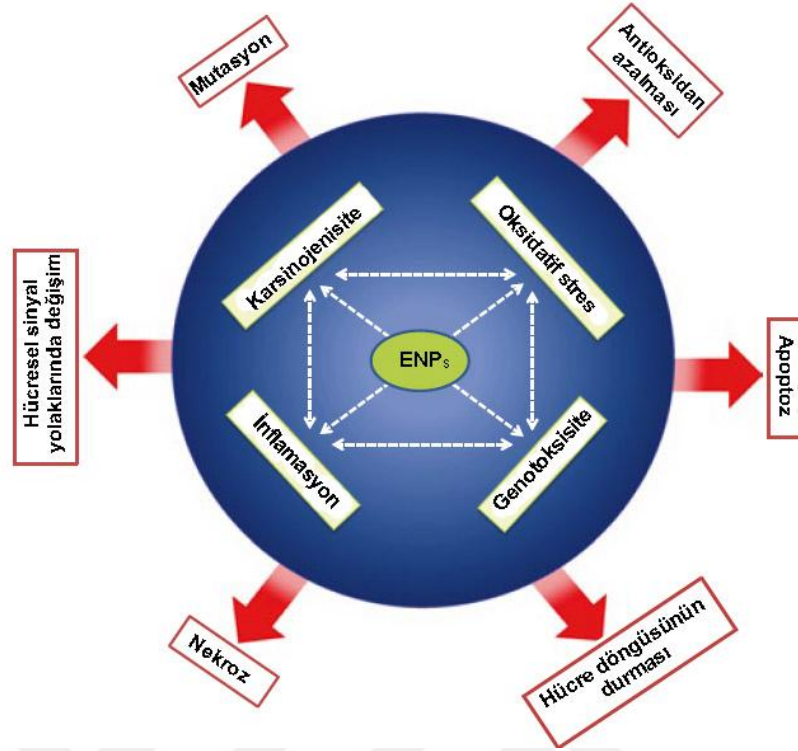
2.4.1. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri

Nanobilim ve nanoteknolojide nanomateryallerin eşsiz özelliğinden dolayı geçtiğimiz on yıl boyunca büyük artış görülmüştür. Endüstriyel nanopartikül sentezinde, görüntülenmesinde ve analiz araçlarında büyük ilerleme olmuştur. Yüksek yüzey alanı, atomların geniş fraksiyonu, yüzeydeki bol reaktif alan gibi eşsiz özellikler endüstriyel uygulamalar ve tüketiciler için bu materyalleri eşsiz kılar. Tüketici ürünlerindeki endüstriyel nanopartiküllerin önemli derecede yükselmesi, insan ve çevre maruziyetinin riskini arttırır. İnsanlar çeşitli aşamalarda nanopartiküllere maruz kalırlar. Bu aşamalar; nanopartikül sentezi (laboratuvarlarda), üretim (endüstri), kullanım (tüketilen ürünler, araçlar, ilaçlar) ve çevre (kontamine su, hava partikülleri ve imha)'dir (Şekil 2.9. Nanopartiküllerin yaşam siklusu ve çeşitli ekosistemlerde insanların nanopartiküllere maruziyeti) [Kumar ve Dhawan, 2013].



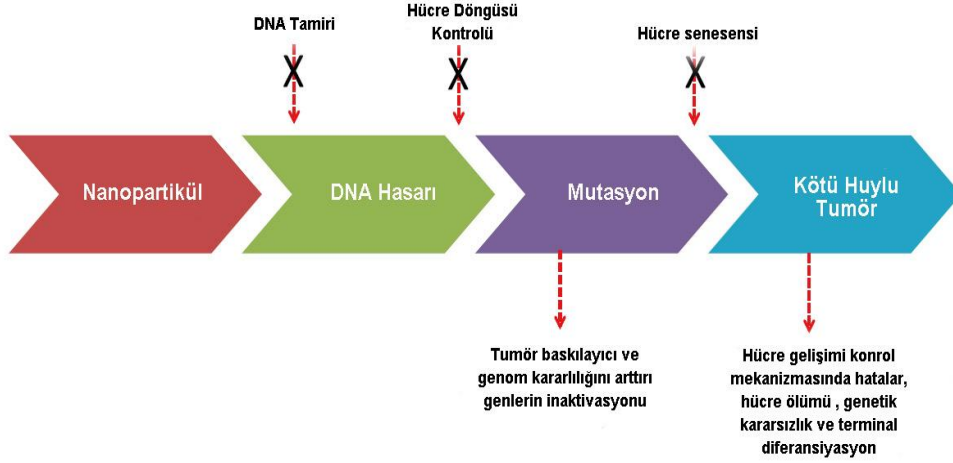
Şekil 2.9. Nanopartiküllerin yaşam siklusu ve çeşitli ekosistemlerde insanların nanopartiküllere maruziyeti [Kumar ve Dhawan, 2013].

Nanopartikül maruziyetinin biyolojik sistemlerde genotoksisite, sitotoksisite ve karsinojeniteye neden olduğu bilinmektedir. Bu olaylar birkaç şekilde gerçekleşebilir (Şekil 2.10. Nanopartiküllerin hüresel etkileri[Kumar ve Dhawan, 2013]). Genetik materyalin nanopartiküllerle doğrudan etkileşimi, reaktif oksijen türlerinin üretimi boyunca dolaylı hasar, çözülebilir nanopartiküllerden toksik iyonların üretilmesi, sitoplazmik ve nükleer proteinlerle etkileşim, mitotik ipliklere veya onun bileşenlerine bağlanma, oksidatif strese yükselme, hücre siklusu kontrol noktalarının işlevinde bozulma, antoksidant savunmanın baskılanması sayılabilir [Kumar ve Dhawan, 2013].

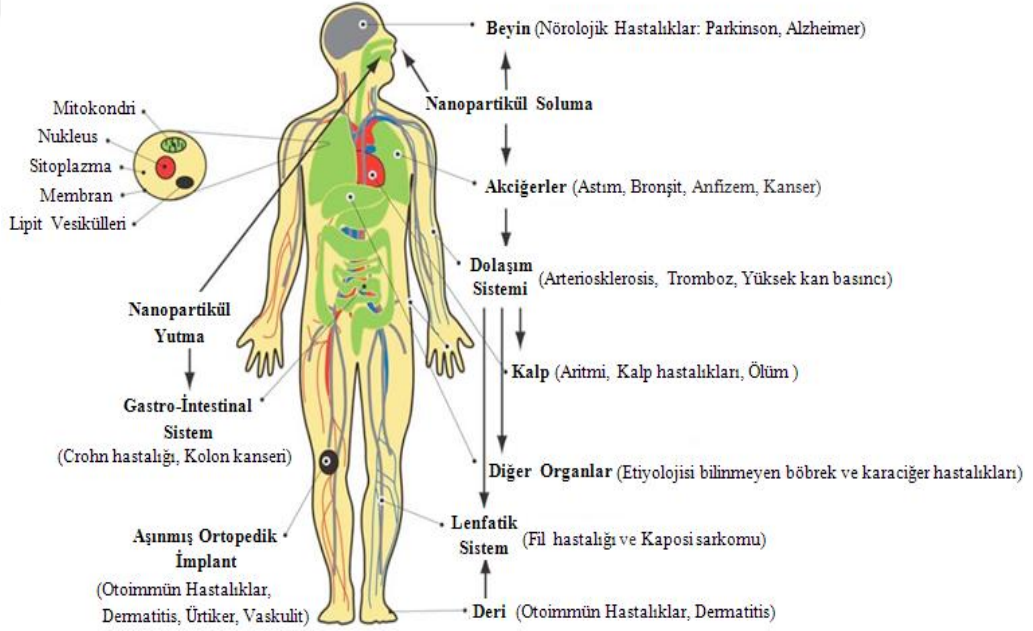


Şekil 2.10. Nanopartiküllerin hücresel etkileri [Kumar ve Dhawan, 2013].

Nanopartiküllerin genotoksisitesi; prokaryotik sistemler, hücre kültürleri, *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanılarak değerlendirilebilir. Genotoksitenin gösterilmesinde ilk olarak AMES testi kullanılmıştır. Akabinde, endüstriyel nanopartiküllerin memeli hücre kültürlerinde neden olduğu DNA hasarlarını değerlendirmede farklı testler kullanılmıştır. Bu testler; komet testi, gen mutasyon testi, mikronucleus testi ve kromozom aberasyon testidir. Endüstriyel nanopartiküllerle gerçekleştirilmiş bir çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma mevcuttur.



Şeki 2.11.Genotoksisite ve Karsinojeniteye Neden Olan Nanopartiküllerin Hücresel Proseslerle İlişkisi [Kumar ve Dhawan, 2013].



Şekil 2.12. İnsan vücudunun nanopartiküllere maruz kalma yolları, etkilenen organlar ve ortaya çıkabilecek hastalıklar [Atlı-Şekeroğlu, 2013].

Çevrede bulunan nanopartiküllerin genotoksitesinin değerlendirilmesine yönelik bir çok çalışma bulunmaktadır. Bunlar Çizelge 2.6.'da gösterilmiştir [Kumar ve Dhawan, 2013].

Çizelge 2.6. Endüstriyel Nanopartiküllerin İn Vitro Genotoksitesine Dair Seçilmiş Çalışmalar [Kumar ve Dhawan, 2013].

Nanopartikül Tipi	Faz/Büyüklik	Genotoksite Testi	Sonuç	Referans
Titanyu dioksit (TiO ₂)	Anataz 10, 20, 200, >200nm ve rutil, 200nm	FPG-modifiye komet testi, CBMN testi	Anataz partikülünün fotokatalitik aktivitesi rutil formdan daha yüksek olmuştur. Rutil partiküller ışık yokluğunda oksidatif DNA hasarına neden olmuştur. Fakat 200nm lik anataz partikülleri böyle bir hasara neden olmamıştır.	Gurr vd., 2005.
	Organik ve inorganiklerle kaplanmış ultrafin partiküller, 14-60nm	Kromozomal aberasyon	UV varlığında ve yokluğunda kromozomal hasar sıklığında yükselme olmamıştır.	Theogaraj vd., 2007.
	100nm	CBMN test, komet testi ve HPRT gen mutasyon testi	130µg/ml'lik maruziyette CBMN sıklığı 2-3 kat ve mutasyon sıklığı 2,5 kat yükselmiştir. 65µg/ml'lik maruziyette komet kuyruk uzunluğu 5 kat artmıştır.	Wang vd., 2007.
	25nm	CBMN testi ve komet testi	Mikronükleus sıklığı yükselmiştir. ROS üretimi ve p53 aracılıklı DNA hasar kontrol noktasındaki sinyallerin aktivasyonu artmıştır.	Kang vd., 2008.
	Degussa P25, 24,4±0,5nm	FPG ile modifiye komet testi ve CBMN testi	UVA ışınlama partikülleri DNA zincir kırıklarına neden olmuştur.	Vevers ve jha., 2008.
	40nm rutil, <25nm anataz ve 5µm bulk	Komet testi	Nano büyüklükteki anatazrutilden daha etkili olmuştur. Fakat hiçbiri DNA hasarını başlatıcı olmamıştır.	Falck vd., 2009.

‘Çizelge 2.6. (devamı)’

	anataz	Komet testi	Tüm konsantrasyonlarda DNA hasarını önemli seviyede yükseltmiştir.	Gopalan vd., 2009.
	Anataz, 5 ve 40nm	HPRT gen mutasyon testi	TiO ₂ nanopartikülleri hücreler tarafından alınmıştır ve MEF hücrelerinde mutasyon sıklığına neden olmuştur.	Xu vd., 2009.
	anataz<25nm, rutil<100nm	FPG- ve Endo III modifiye komet testi, real time PCR ile DNA hasarı üzerine ekspresyon çalışmaları	Anataz partikülleri, rutillerden daha çok DNA hasarına neden olmuştur. Aksine, rutil form anatazla karşılaştırıldığında oksidatif stresle ilişkili genleri uyarda daha güçlü olmuştur.	Petkovic vd., 2011.
	20±7nm	MN ve SCE testi	MN sıklığı 0.5 ve 1µg/ml’lik konsantrasyonda yükselmiştir. ancak SCE sıklığı 1-5µg/ml’lik konsantrasyonda yükselmiştir.	Di Virgilio vd., 2010.
	Anataz 50nm	FPG modifiye komet testi ve CBMN testi	A 431 hücrelerinde 0.8, 8 ve 80µg/ml’lik konsantrasyonlara maruziyet sonrasında oksidatif DNA hasarı ve mikronükleus sıklığı önemli derecede yükseldiği gözlenmiştir.	Shukla vd., 2011b.
	Anataz, oval şekil, uzunluk 76±41nm, genişlik 53±22nm	Koet testi	DNA hasarını yükseltmemiş.	Hackenberg vd., 2011a.
	Anataz, 50nm	FPG modifiye komet testi ve CBMN testi	Oksidatif DNA hasarı ve MN sıklığı doza bağlı olarak yükselmiştir.	Shukla vd., 2013.
	Anataz<100nm	Elektron paramagnetik rezonans (EPR) 8-OHdG	TiO ₂ maruziyeti ne DNA kırığı ne de serbest radikal üretimi göstermemiştir.	Bhattacharya vd., 2009.

‘Çizelge 2.6. (devamı)’

		analizi		
	140±44nm, %79 rutil ve %21 anataz	Ames testi ve kromozomal aberrasyon testi	Her iki testte negatif sonuç vermiştir.	Warheit vd., 2007.
	63nm	Komet testi ve komet test (FPG)	DNA hasarında önemli yükselme gözlenmiştir.	Karlsson vd., 2008a.
		Mikronukleus ve kardeş kromatit değişim testi.	SCE sıklığının yanı sıra MN sıklığı da maruziyet dozlarına bağlı olarak yükselmiştir.	Turkez ve Geyikoğlu, 2007.
		Komet testi	Doza bağlı olarak DNA hasarı yükselmiştir. Oksidatif lezyon ölçülmemiştir.	Karlsson vd., 2008b.
Çinko oksit (ZnO)	100nm	Kromozomal aberrasyon testi	Nanopartiküller tüm şartlar altında klastojenik bulunmuştur.	Dufour vd., 2006.
	30nm	Komet testi	Doza bağlı olarak önemli DNA hasarı elde edilmiştir	Sharma vd., 2009.
	10 ve 20nm	FPG enzimli ve enzimsiz komet testi	FPG’li ve FPG’siz tüm nanopartikül maruziyetli hücrelerde önemli DNA hasarı elde edilmiştir.	Gerloff vd., 2009.
	19.6±5.8nm	Komet testi	5 ve 10µg/ml’lik konsantrasyonda önemli genotoksik etki elde edilmiştir.	Yang vd., 2009.
	70±13ve 420±269nm	Komet testi	10, 12 ve 14 µg/ml’lik konsantrasyonda önemli DNA hasarı elde edilmiştir.	Gopalan vd., 2009.
		Standart alkalın komet testi	ZnO nanopartiküllerine maruz kalan her iki hücre tipinde de önemli seviyede DNA hasarı meydana gelmiştir.	
	30nm	Komet testi ve CBMN testi	Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak DNA ve sitogenetik hasar yükselmiştir.	Osman vd., 2010.
	30nm	FPG’li ve FPG’siz komet	Komet testi ile önemli DNA hasarı elde	Sharma vd.,

‘Çizelge 2.6. (devamı)’

		testi	edilmiştir.	2011b.
	30nm	Komet testi	Maruziyetli hücrelerde DNA hasarında önemli yükselme elde edilmiştir.	Sharma vd., 2011a.
	Oval şekilli, uzunluk 76±41nm, genişlik 53±22nm	Komet testi	İnsan nazal mukoza hücrelerinde aruziyetten 24 saat sonra nanopartiküllerin çoğalan genotoksik etkisi gözlemlenmiştir.	Hackenberg vd., 2011c.
	71nm	FPG’li ve FPG’siz komet testi.	Önemli DNA hasarı elde edilmiştir.	Karlsson vd., 2008a.
Demir oksit	<70nm	Komet testi	Hücrelerin nanopartikül maruziyeti sonrasında genotoksisite elde edilmemiştir.	Auffan vd., 2006.
	29nm, Fe ₂ O ₃	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	Herhangi bir konsantrasyonda önemli DNA hasarı elde edilmemiştir.	Karlsson vd., 2008b.
	20-30nm, Fe ₃ O ₄	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	Oksidatif DNA hasarı sadece 80µg/ml’lik konsantrasyonda bulunmuştur.	Karlsson vd., 2008a.
	30-60nm, Fe ₂ O ₃	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	Mikro partiküller 80µg/ml’lik konsantrasyonda DNA hasarına neden oluyorken, nanopartiküller önemli DNA hasarı oluşturmamıştır. Oksidatif DNA hasarı elde edilmemiştir.	Karlsson vd., 2009.
	20-40nm, Fe ₃ O ₄	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	Mikro partiküllere maruz kalan hücrelerdeki DNA hasarı nanopartiküllere maruz kalan hücrelerdekinden daha yüksek olmuştur. Oksidatif stres ise nanopartikül maruziyetli hücrelerde	Karlsson vd., 2009.

‘Çizelge 2.6. (devamı)’

			mikro partiküllere maruz kalan hücrelerden daha yüksek olmuştur	
	50nm	Alkalin komet testi ve ELİSA metodu kullanarak 8-OH-dG'nin ortaya çıkarılması.	BEAS B2 hücrelerinin aksine, IMR 90 hücrelerinde 50 ve 250µg/ml'lik konsantrasyonlarda önemli DNA hasarı bulunmuştur. Ancak 8-OH-dG seviyesinde önemli yükselme gözlenmemiştir.	Bhattacharya vd., 2009.
	311nm	Komet testi ve CBMN testi	4 saatlik maruziyetten sonra konsantrasyona bağlı olarak DNA hasarı gözlenmiştirAncakMN sıklığı 24 saatlik maruziyetten sonra önemli olmuştur.	Konczol vd.,2011.
Seryum oksit	7 ve 320nm	Komet testi	60µg/ml ve üstündeki konsantrasyonlarda önemli DNA hasarı elde edilmiştir. Ayrıca nanoceria bulkları daha genotoksik bulunmuştur.	Auffan vd., 2009.
	5-20nm	Oxy DNA assay kit kullanılarak 8-OH-dG	20 ve 30 dakikalık maruziyetten sonra 8-OH-dG seviyesi önemli seviyede yükselmiştir.	Rothen-Rutishauser vd., 2009.
	5.4nm	Komet testi ve SCE testi	Maruziyetli hücrelerde önemli DNA hasarı ve SCE elde edilmemiştir.	Pierscionek vd., 2010.
	3-5nm	Komet testi	Önemli DNA hasarı elde edilmemiştir.	Daş vd.,2012.
Aluminyum oksit	<50nm	Alkalin komet testi	S9'lu ortamda nanopartiküllerin tüm konsantrasyonlarında L5178Y hücrelerinde önemli DNA hasarı bulunmuştur.S9'suz ortamda ise sadece en yüksek konsantrasyonda önemli DNA hasarı ortaya çıkmıştır.S9'suz	Kim vd., 2010.

‘Çizelge 2.6. (devamı)’

			ortamdaki tüm nanopartikül konsantrasyonlarında BEAS-2B hücrelerinde DNA hasarı görülmüştür.	
	0.2nm	CBMN testi, gama H2AX immuno işaretli sitogenetik analiz(FISH)	Al ₂ O ₃ nanopartikülleri kontrolle karşılaştırıldığında mikronukleus sıklığı önemli ölçüde yükseltmiştir.Al ₂ O ₃ nanopartiküllerinin 2mg/T-75’lik konsantrasyonuna maruz kalan örneklerde kromozom kaybı ve poliploidi gözlenmiştir.	Tsaousi vd., 2010.
	28nm	Mikronukleus testi, kardeş kromatit değişimi	0.5-10µg/ml’lik konsantrasyonda mikronukleus sıklığında yükselme gözlenmiştir.Ancak kardeş kromatit değişimi 1-25µg/ml’lik konsantrasyonda elde edilmiştir.	Di Virgilio vd., 2010.
Bakır oksit	42nm	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	Konsantrasyona bağlı olarak oksidatif DNA hasarının yükseldiği gözlenmiştir.	Karlsson vd.,2008a.
	20-40nm	Alkalin ve FPG modifiye komet testi	FPG lezyonlarının indüksiyonunanopartikül maruziyetli hücrelerde meydana gelmiştir.aksine makro partiküllere maruz kalan hücrelerde önemli FPG lezyonu elde edilmemiştir.	Karlsson vd., 2008a.
	28nm	Alkalin komet testi	Nanopartikül maruziyetli hücrelerde DNA hasar gözlenmiştir.	Midander vd., 2009.
Gümüş	30nm	Kromozom aberasyonu ve anöploidi	Doza bağlı kromozom aberasyonu ve medaka balık hücre hattında anöploidi.	Wise vd., 2010.
	6-20nm	Komet testi, CBMN	Kanserli hücrelerde kromozom aberasyonlarından daha çok DNA	Asha Rani vd., 2009.

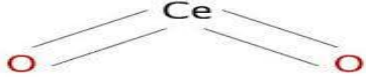
‘Çizelge 2.6. (devamı)’

			aberrasyonları öne çıkıyor.	
	25nm polisakkarit yüzeyli ve kaplanmamış nanoküre	DNA tamir yolak genlerinin immüno blot analizi	P53, rad51 ve fosforile H2AX protein ekspresyonunun upregülasyonunda kaplanmış gümüş nanopartikülleri kaplanmamış nanopartiküllerden daha fazla hasara neden olmuştur.	Ahamed vd., 2008.

2.4.2.Seryum Dioksit

Seryum dioksit geniş uygulama alanına sahiptir. Katalizlemeye ve fosforlama/işildamaya neden olurlar. Solar hücrelerde, katı yakıt hücrelerinde, ultraviyole absorblamada, otomotiv katalitiklerinde dönüştürücü, gaz sensörleri, oksijen pompaları ve cam/seramik uygulamalarında yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Seryum dioksit nanopartikülleri ayrıca otomotiv endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır [Cheng vd., 2013]. Seryum dioksitin fiziksel özellikleri Çizelge 2.7.'de gösterilmiştir [US EPA 2009].

Çizelge 2.7. Seryum dioksitin fiziksel özellikleri [US EPA, 2009].

Adı	Seryum oksit
CASRN	1306-38-3
Sinonimi	Seryum dioksit;Serya;Serik oksit;Seryum (IV) oksit
Yapısı	
Moleküler Ağırlığı	172.11
Moleküler Formülü	CeO ₂
Form	Soluk sarı;ağır toz(saf olduğu zaman beyaz);ticari ürün kahverengi
Erime Noktası	2400°C
Yoğunluğu	7.65g/cm ³
Çözünürlük	Suda ya da dilue asitlerde çözünmez.

2.4.3.Seryum Dioksitin Genotoksik Etkileri

Seryum dioksitin genotoksik etkilerine dair farklı hücre hatlarında ve canlılarda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Çalışmalardan elde edilen sonuçlarda

farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda seryum dioksitin genotoksik olduğu bazı çalışmalarda ise antigenotoksik olduğu vurgulanmaktadır.

Barbara ve arkadaşları [2012], insan lens epitel hücrelerinde nanocerianın maruziyet süresi ve yüksek doz uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Üç farklı doz (10, 20 ve 100µg/mL) ve iki farklı sürede (48 ve 72 saat) DNA hasarı ve hücre büyümesini değerlendirmişlerdir.

Lopez-Moreno ve arkadaşları [2010], CeO(2) ve ZnO nanopartiküllerine maruz bırakılan fasulye bitkilerinde, bu partiküllerin genotoksitesine ve biyotransformasyonuna bakmışlardır.

Mast hücrelerinin CeO(2) nanopartiküllerine inflamasyon cevabında nasıl bir etkisi olduğunu araştırmak için gerçekleştirilen çalışmada, fare mast hücre hatları kullanmışlardır [Wingard vd., 2011].

Srinivas ve arkadaşları [2011], ratlarda burun yoluyla seryum oksit nanopartikülüne maruziyetten sonra potansiyel akut toksisiteyi değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak solunum yoluyla seryum oksit nanopartiküllerinin akut maruziyeti sonrasında oksidatif strese bağlı olarak sitotoksite meydana gelebileceği ve kronik inflamator cevap başlayabileceğini belirtmişlerdir.

Giri ve arkadaşları [2013], ovaryum kanserli hastaları tedavi etmek amacıyla antioksidant özelliklere sahip seryum oksit nanopartikülü nanocerianı geliştirmişlerdir ve ovaryum kanserli hastalarda tedavi edici ajan olarak kullanmışlardır.

Hussain ve Garantziotis [2013], çevresel ve medikal olan nanometal seryum dioksit nanopartikülü ile maruziyetten sonra insan monositlerinde apoptoz ve otofaji arasındaki etkileşimi araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre seryum dioksit nanopartikülünün, öncül ölüm mekanizmasına etki ederek otofajiye neden olduğu ve insan monositlerinde sitotoksiteyi yükseltmeye başladığını gözlemlemişlerdir.

Hussain ve arkadaşları [2012], endüstriyel alanlarda ve tedavi amaçlı uygulamalarda yaygın olarak kullanılan seryum dioksit nanopartikülünün sitotoksik etkilerini sağlıklı gönüllülerden elde edilen monositlerde değerlendirmişlerdir. Sonuç

olarak seryum dioksitin test edilen bu konsantrasyonunu primer insan monositlerinde toksik bulmuşlardır.

Garcia ve arkadaşları [2010], seçtikleri inorganik nanopartiküller üzerinde birkaç standart toksisite testini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında nanopartikül olarak seryum oksit, titanyum dioksit ve demir oksiti seçmişlerdir. Toksikite testi olarak *Daphnia magna* ve bioluminesant testini (Microtox) kullanmışlardır. Sonuç olarak, çok düşük seryum dioksit konsantrasyonlarının dahi toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Hirst ve arkadaşları [2011], 0,5mg/kg dozunda olacak şekilde nanoceriyayı farelere 2 ve 5 hafta boyunca ağızdan, damardan ve karın içine uygulamışlardır ve nanocerianın antioksidant yeteneğini ve biyolojik dağılımını *in vivo* yöntemlerle kapsamlı olarak araştırmışlardır. Sonrasında karbon tetraklorite maruz bırakılan farelerde, nanoceria uygulamasının ROS azaltıp azaltmadığını incelemişlerdir. Yapılan *in vivo* çalışmada, nanoceria uygulanan farelerin karaciğerinde gözlenen toksisite ile N asetil sistein uygulanan farelerde benzer bulgular gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular, seryum oksit nanopartiküllerinin oksidatif stresi azaltmada antioksidant olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Lord ve arkadaşları [2012], insan monosit hücre hattında (U937) seryum oksit nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerinin düzenlenmesini ve hücre alınımlarını araştırmışlardır. Çalışma sırasında büyüklüğü 3-94nm olan romboedrik şekilli nanopartiküller kullanmışlardır. Monositler ve makrofajların inflammatör sistemlerde önemli rol oynaması ve makrofajlarda üretiminin hücre sinyali üzerine önemli etkilere sahip olmasından dolayı nanocerianın etkilerinin araştırılması için insan monosit hücre hattı kullanılmıştır. Forbol 12 miristat 13 asetat varlığında aktive olan U937 hücrelerinin nanoceriyaya U937 hücrelerinden daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak bütün nanoceria partiküllerinin ROS yakalamada eşit etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Al-Nsour ve arkadaşları [2012]; insan primer hücrelerindeki etkisi tam olarak bilinmeyen, endüstriyel uygulamalarda yoğun kullanılan ve tedavi uygulamalarında potansiyele sahip seryum dioksiti çalışmışlardır. Çalışmalarını

sağlıklı gönüllülerden toplanan kan örneklerinden izole edilen CD14+ hücrelerinde gerçekleştirmişlerdir. Hücreleri CeO₂'nin 0,5 ve 1µg/ml'lik konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat boyunca lipopolisakkaritli (10ng/mL) ve lipopolisakkaritsiz olarak maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonrasında inflamatör cevabın değişimi, salgılanan tümör nekrosis faktör-α, interlökin-1β, makrofaj kemotaktik protein-1, interferon-gamma ve interferon gama-uyarılmış protein 10'un ölçülmesi ile takip etmişlerdir. Sitokin salgılarının miktarında lipopolisakkaritli ve lipopolisakkaritsiz gruplarda fark gözlemlenmemişlerdir.

Poma ve arkadaşları [2013], seryum dioksit nanopartiküllerinin sitotoksosite ve genotoksitesini kısa dönem (24 saat) ve uzun dönemde (10 gün) farklı hücre hatları kullanarak *in vitro* ortamda araştırmışlardır.

Rico ve arkadaşları [2013], bitkiler tarafından alındığı bilinen fakat bitkiler üzerindeki fizyolojik etkileri iyi bilinmeyen seryum oksit nanopartiküllerinin prinçteki etkilerini araştırmışlardır.

Oliveira ve arkadaşları [2014]; toryum, seryum ve lantanum etkileşiminin insan T-lenfosit lösemi hücre hattındaki toksisitesini araştırmışlardır. Toryum ve seryum lenfositlere ayrı ayrı uygulandığında toksik etki göstermemiştir. Ancak, toryum lantanumla birlikte lantanumun toksisitesini yükseltmiştir. Karışım şeklinde uygulandığında düşük konsantrasyonlarda bile lenfositlerin canlılığında azalma meydana geldiğini gözlemlenmiştir.

Kumari ve arkadaşları [2014] tarafından, seryum oksit nanopartiküllerinin ve seryum oksitin mikropartiküllerinin farklı konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılan insan nöroblastoma hücre hattında sitotoksik, genotoksik ve oksidatif stres cevabı çalışılmıştır. Çalışma sırasında, sitotoksiteyi 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium bromid ve laktat dehidrojenaz testini kullanarak araştırılmıştır. Genotoksite değerlendirilmesini ise sitokinezi bloke edilmiş mikronukleus testi ve komet testini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada gerçekleştirilen testler reaktif oksijen türlerinin nanocerianın toksisitesinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Sonuçlar nano büyüklükteki seryum dioksitin seryum oksit mikropartiküllerinden daha toksik olduğunu göstermiştir.

Antisari ve arkadaşları [2013], mühendislikte kullanılan metal oksit nanopartiküllerinin topraktaki dağılımını, bulunma oranlarını ve mikrobiyal biyokütle üzerine etkilerini araştırmışlardır.

2.5. HİSTON PROTEİNLERİ

Ökaryotik hücreler farklı büyüklükte genoma sahiptirler (*Saccharomyces cerevisia*'da 12×10^6 baz çifti, insanda ise 6×10^6 baz çifti). Genom, DNA fiberinin 4mm'sinde veya 2 metreden daha fazlasında konumlanmış durumdadır. Bu DNA, histon bağlanması ve nukleozomların yoğunlaşması ile yaklaşık 0.01mm boyutuna gelir ve hücreyle bütünleşir. Nukleozom 145 baz çiftlik DNA ve 8 histondan oluşur. Nukleozomda histon ailesinin her birinden iki tane; H4, H3, H2B, H2A bulunur. Nukleozomlar arasındaki 20 baz çiftlik DNA mesafesi bağlayıcı H1 ile sağlanır. Memelilerde, 4 m boyutundaki DNA mitotik kromozomun 700nm'lik kolunun 120µm'sinde yoğunlaşmıştır [Redon vd., 2002].

Nukleozomal histon ailesinin ikisi, H3 ve H2A'dır. Bu histonlar özelleşmiş işlevleriyle yüksek derecede korunmuştur. Son çalışmalar, H2A ailesinin iki çeşidinin rolünü açıklamaya başlamıştır. Bunlar H2AX ve H2AZ histon proteinleridir. H2AX'in, DNA çift zincir kırıklarının belirlenmesine aracılık ettiği düşünülmektedir. H2AZ'nin ise nukleozom modelleme kompleksinde kendiliğinden oluştuğu ve transkripsiyonel kontrolü içerdiği düşünülmektedir [Redon vd., 2002].

H2A'nın varyantları olan H2AX ve H2AZ 1980'de tanımlanmıştır. Her iki varyant da yüksek derecede korunmuş dizilerdir. Peptid haritası ve büyüklük temel alındığında H2AX'in H2A türlerinden daha uzun karboksil terminal bölge içerdiği kanaatine varılmıştır. İnsan H2AX cDNA'sı izole edildiğinde bu cDNA'nın *S.cerevisia* ve *S.pombe* ile yüksek homoloji göstermiştir. Bu sonuçlar karboksil terminusunda korunmuş dört serin kalıntısının bulunduğunu desteklemiştir. Histon dizileri çoğaltıldığı zaman H2AX homologlarının hayvan, bitki, mantar ve çeşitli protistlerde evrimsel süreç boyunca bulunduğu açık bir şekilde ortaya çıkmıştır [Redon vd., 2002].

H2AX 1980'lerin sonunda dizilenmiştir. Çalışmalar, diğer memeli H2A izoformlarında bulunmayan kısa COOH terminal kuyruğunun varlığını göstermiştir.

H2AX, major H2A türünü oluşturmaktadır. H2A ailesinin diğer üyeleri gibi H2AX Ser 1'de fosforillenme, Lys 5'te asetillenme ve Lys 119'da ubikuitinlenme meydana gelebilmektedir. Fakat H2AX'i eşsiz kılan şey COOH ucunda lokalize olmuş olan dört aminoasitten serinin yüksek derecede korunmuş olmasıdır. Hücre DNA hasarıyla karşılaştığında serin hızlı bir şekilde fosforillenir ve γ -H2AX'i oluşturur. Her ışına bir DNA çift zincir kırığına karşılık gelmektedir [Fernandez-Capetillo vd., 2004].



3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYALLER

Deneysel düzeneğin kurulması için gerekli olan çözelti ve tamponlar geleneksel yöntemlere göre hazırlanmış ve cihazlarda kullanılacak hale getirilmiştir. Analitik standarttaki saf spirotetramat ve seryum dioksit Sigma firmasından elde edilmiştir. Deneyselerde pozitif kontrol olarak kullanılan hidrojen peroksit Merck firmasından, çözücü kontrol olarak kullanılan etanol ise Sigma firmasından elde edilmiştir.

3.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Besiyeri: 100ml'lik RPMI 1640'a 25ml inaktive fetal bovin serum, 1.3ml L-Glutamin, 1ml penisilin-streptomisin, 1ml amfoterisin B ve 4ml fitohemaglutinin eklenecek hazırlanmıştır.

PHA (Fitohemaglutinin): 1.2 mg toz halindeki PHA'ya 5ml steril distile suyun eklenmesiyle hazırlanmıştır.

Hipotonik Çözeltisi: 0.5592gr KCl 100ml bidistile suda çözülmüştür (0.075M).

Fiksatif: Fiksatif olarak karnoy fiksatif kullanılmıştır. 3 birim metanol 1 birim asetik asit kullanılarak hazırlanmıştır.

%5'lik Giemsa Boyama Çözeltisi: 5ml giemsa solüsyonu 95ml distile suya karıştırılarak mikronukleus testinin boyası elde edilmiştir.

Sitokalsin-B Solüsyonu: 5mg sitokalsin B 500µl dimetil sülfoksit içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Kullanım sırasında 150µl stok çözeltiden alınıp steril su ile 10ml'ye tamamlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agar (NMA): 0.25gr NMPA, 50ml PBS içerisinde eritilerek hazırlanmıştır.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMA): 0.13gr LMA, 20ml PBS içerisinde eritilerek hazırlanmıştır.

3.1.2. Tamponların Hazırlanması

Fosfat Tamponu (PBS) : 2.4gr PBS 250ml steril suda çözülürken hazırlanmıştır.

Lizis Solüsyonu(500ml, pH:10) : 73.05gr NaCl, 18.6gr EDTA, 0.6gr Trizma 350ml steril suya eklenmiştir. 20 dakika sonra 4gr NaOH ve 95ml distile su bu solüsyona eklenmiştir. Solüsyon berrak bir renk alınca pH'ı 10'a ayarlanmıştır ve çalışma anına kadar +2/+8'de buzdolabında saklanmıştır.

Elektroforez Solüsyonu (1.5L, pH:13) : 18gr NaOH ve 0.63gr EDTA tartılmıştır. Üzerine 1.5L distile su eklenmiştir. Kimyasallar tamamen eridikten sonra pH 13'e ayarlanmıştır ve çalışma anına kadar solüsyon +2/+8'de buzdolabında saklanmıştır.

Nötralizasyon Tamponu (500ml, pH:7.5): 24gr Tris 500ml distile su içerisinde eritilerek hazırlanmıştır. pH 7.5'e ayarlanmıştır ve çalışma anına kadar solüsyon +2/+8'de buzdolabında saklanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

OWL Elektroforez cihazı OSp-300: DNA kırıklarının jel üzerinde yürütülmesini sağlamak için kullanıldı.

Mikroskop Micros Austria AC 220V 50HZ: Mikronükleus preparatlarının gözlenmesinde kullanıldı.

Hassas terazi Kern 220-4: Kimyasal ölçümlerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.

pH Metre inoLab WTW: Solüsyonların pH'larının belirlenmesinde kullanıldı.

Santrifüj Nüve NF 815 : Lenfositlerin izole edilmesi sırasında kullanıldı.

Hot Plate MSH Basic IKA WERKE GMBH&CO K6 D79219 Staufen: Komet testi için lamaların hazırlanması sırasında ve solüsyonların hazırlanmasında kullanıldı.

DIC ataçmanlı Olympus BX40 Floresan Mikroskopu UND6-2: Komet ve gama H2AX preparatlarının gözlenmesinde kullanıldı.

Arçelik Buzdolabı: Solüsyonların soğutulması sırasında ve komet testinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.

Sıcak su banyosu Nahita, 601/12: Komet testinin gerçekleştirilmesi sırasında kullanıldı.

İnkübatör ESCO CCL-170A-8: Lenfosit kültürlerinin inkübasyonunda kullanıldı.

SafeFAST Elite Class II Microbiological Safety Cabinets: Lenfositlerin kültür ortamına ekilmesi sırasında kullanıldı.

LSM 700 ZEISS Konfokal Mikroskop: Gama H2AX analizinin görüntülenmesinde kullanıldı.

Ultrasonik Banyo-Bandelin : Seryum dioksit dozlarının hazırlanması sırasında kullanıldı.

3.2. YÖNTEM

Test edilecek olan spirotetramat ve seryum dioksit için deneylerde kullanılacak olan doz aralıkları daha önceki çalışmalar ve insanların maruz kaldığı dozlar gözönünde bulundurularak kararlaştırılmıştır [Pesticide residues in food — 2008; Mohapatra vd., 2012; Hussain vd., 2012; U.S. EPA, 2009]. Deneylerde uygulanacak maruziyet süreleri ise, komet testi için yapılan ön çalışmalarla kararlaştırılmıştır. Mikronukleus testi için ise hücrelerin bölünme geçirmesi gerektiğinden düzenleme buna göre gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılacak spirotetramat dozları 25, 50 ve 75µg/ml olarak belirlenmiştir. Maruziyet süresi ise hem komet testi hem de mikronukleus testi için 48 ve 72 saat olarak uygulanmıştır. Seryum dioksit için dozlar 6, 12 ve 18µg/ml olarak belirlenmiştir. Maruziyet süresi ise komet testi için 3 saat, mikronukleus ve gama H2AX testi için 24 saat olarak uygulanmıştır. Deneyler sırasında pozitif kontrol olarak hidrojen peroksitin 100µM'lık konsantrasyonu, çözücü kontrol olarak ise etanolün %0.05'lik konsantrasyonu kullanılmıştır.

3.2.1.Kanların Alınması

Sigara-alkol kullanmayan 23-33 yaş aralığında sağlıklı 4 erkek ve 4 kadın bireyden heparinli enjektöre tam kan alınmıştır. Alınan kanlar işlemlere kadar +2/+8 buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2.Mikronukleus Testi İçin Kültürün Oluşturulması

Kan ekim işleminden önce kültür kapları -20°den çıkarılarak vasatın sıcaklığının 37°ye gelmesi sağlanmıştır. Vasatın sıcaklığı 37°ye geldiğinde sağlıklı gönüllülerden alınan heparinli kan örnekleri her tüpe 500µl olacak şekilde steril kabin içerisinde eklenmiştir. İnkübasyon süresi 48 ve 72 saat olarak ayarlanmıştır. Spirotetramat'ın ilgili konsantrasyonları tüplere 0.saatte ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 100µM'lık hidrojen peroksit kullanılmıştır. Çözücü kontrol olarak ise %0.05'lik etanol kullanılmıştır.

3.2.2.1.Mikronukleus testinin gerçekleştirilmesi

Kültürü yapılan lenfositlerin inkübasyon süresi sona erdiğinde preparasyon işlemleri gerçekleştirilir. Preparasyon işlemleri şu basamaklar izlenerek gerçekleştirilir:

-2000 rpm'de 10 dakika santrifüj

-Süpernatant atılır.

-Çökelti üzerine 37°C'deki hipotonik eriyik yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilir.

-Tüpler 3 dakika oda ısısında bekletilir.

-2000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi tekrar edilir.

-Süpernatant atılır.

-Çökelti üzerine fiksatif damla damla ve tüpler çalkalanarak ilave edilir ve oda ısısında tüpler on dakika bekletilir.

-On dakikalık sürenin sonunda tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

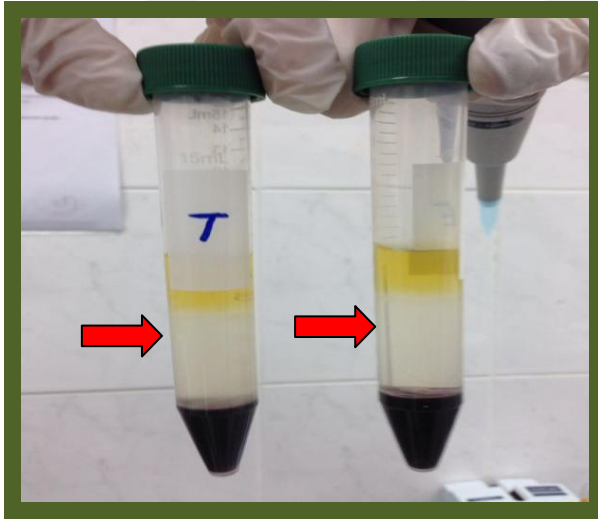
-Süpernatant atılır.

-Çökelti üzerine fiksatif eklenir. Bu işleme tüpün içerisindeki sıvı tamamen berraklaşmaya kadar devam edilir.

İşlem bittiğinde tüpün içerisindeki sıvı temiz lamlara üst üste hücre gelmeyecek şekilde yayma işlemi gerçekleştirilir. Oda ısısında kurutulan lamalar distile su ile hazırlanan %5'lik giemsa boyama solüsyonunda 8 dakika boyanır ve distile sudan geçirilir. Kuruyan preparatlar 10X40'luk objektifte incelenir. Her preparattan 1000 adet binokleuslu hücrede sayım işlemleri gerçekleştirilir.

3.2.3. Lenfosit İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi

Sağlıklı gönüllülerden heparinli enjektörle 4'er mililitre tam kan alınmıştır. Oda sıcaklığına gelmiş histopak solüsyonundan santrifüj tüpüne 3 mili litre eklenmiştir. Histopak üzerine pastör pipeti yardımıyla oda sıcaklığındaki tam kandan 3 mili litre, yavaş yavaş tabaka oluşturacak şekilde eklenmiştir. Sonrasında tüpler oda ısısında 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında arada oluşan lenfosit tabakası (opak tabaka) mikro pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde ependorf tüpüne alınmıştır (Şekil 3.1. Lenfosit izolasyonu). Her tüpten yaklaşık 2-2,5 ml lenfosit tabakası alınmıştır ve PBS ile bire bir oranında seyreltilmiştir.



Şekil 3.1. Lenfosit izolasyonu.

3.2.3.1. Lenfosit Sayımı

Histopak ile izole edilen lenfositler Cedex XS cihazı kullanılarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Cedex XS cihazına uygun Smart Slides üzerine hücreler santrifüj işlemi ile çöktürüldükten sonra üzerine 1ml besiyeri eklenmiştir. Eklenen bu besiyeri ile hücreler karıştırıldıktan sonra pipetaj yapılarak 20µl alınmış ve 20µl

tripan blue ile karıştırılarak Smart Slides üzerine yüklenmiştir. Yükleme gerçekleştirildikten sonra software ekranından New Measure-> Measure yoluyla ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 5 saniyelik ölçüm süresi sonunda sonuçlar ekrana yansımıştır. 'Live' seçeneği yardımıyla ölü ve canlı hücrelerin birlikte farklı renklerle gösterilmesi sağlanmıştır. Tripan Blue sadece ölü hücrelerin içine girerek mavi renkli görünmelerini sağlarken, canlı hücrelerin içine giremediğinden bu hücreler renksiz (saydam) olarak görünmüşlerdir. Yapılan ölçüm sonucunda mili litredeki hücre sayısı 3.5×10^5 bulunmuştur. Totalde yaklaşık olarak 7-8 milyon lenfosit izole edilmiştir.

3.2.4.Komet Testi İçin Lenfositlerin Kültüre Ekilmesi

Daha önce hazırlanıp -20°C 'de saklanan kültür kapları çıkarılarak vasatın sıcaklığının 37° 'ye gelmesi sağlanmıştır. Vasatın sıcaklığı 37° 'ye geldiğinde tüplere ilk olarak 200'ler μl fitohemaglutinin, ardından her tüpe 200 μl izole edilen lenfositlerden steril kabin içerisinde eklenmiştir. Her seryum dioksit konsantrasyonu, pozitif kontrol ve negatif kontrol gruplarına solüsyonlardan 100'er μl eklenmiştir. Ekleme işlemleri tamamlandıktan sonra tüpler 45° 'lik açıyla 37°C 'ye ayarlanmış %5 CO_2 içeren etüve yerleştirilmiştir. Maruziyet süresi (Spirotetramat için 48, 72 saat; seryum dioksit için 72 saatlik inkübasyon sonrasında 3 saatlik maruziyet) boyunca tüpler etüvde saklanmıştır.

3.2.4.1.Komet testinin gerçekleştirilmesi

Maruziyet süresi sonunda komet testini gerçekleştirmek üzere bütün çözeltiler hazırlanmıştır. Maruziyet süresi sona erdiğinde tüpler etüvden çıkarılmıştır. Tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış, tüp içerisinde 0,5ml'lik çökelti kısmı bırakılmıştır. Çökelti kısmı pipetaj yapılmış ve 200 μl düşük erime noktalı agar bulunan ependorf tüpüne 100 μl eklenmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra bu örnekten 100 μl alınmış ve daha önce normal erime noktalı agarla kaplanmış lamlara yayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Yayım işlemi gerçekleştirilen lamalar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında bekletilmiştir. Lamalar bu süre sonunda buzdolabından çıkarılarak üzerinden lameller alınmıştır ve lamalar lizis solüsyonuna yerleştirilmiştir. Lizis solüsyonunda $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki beklemeden sonra

lamlar içerisinde elektroforez solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 20 dakika bu solüsyonda bekleyen preparatlar 25 voltta, 300mA'de 20 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda lamlar nötralizasyon tamponunda bekletilmiştir. Nötralizasyon işleminden sonra kuruyan lamlar %96'lık soğuk etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan preparatlar 80µl etidyum bromür kullanılarak boyanmıştır ve boyanan preparatlar floresan mikroskopta incelenmiştir. Her bireyden 2 preparat hazırlanmış ve her preparattan 100'er hücre sayılmıştır.

3.2.5. Gama H2AX Testi İçin Lenfositlerin Kültüre Ekilmesi

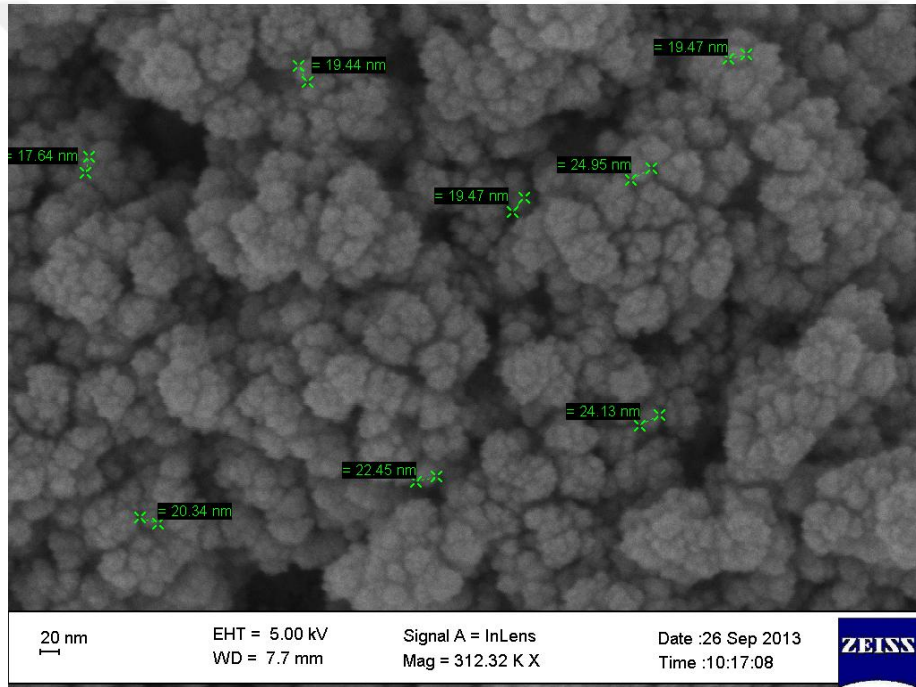
Gama H2AX testi için gönüllülerden heparinli enjektöre tam kan alınmıştır. Sonrasında içerisinde besi ortamı bulunan tüplere 500'er µl heparinli kandan ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Seryum dioksit'in belirlenen konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruziyeti takiben gama H2AX test prosedürü uygulanmıştır.

3.2.5.1. Gama H2AX testinin gerçekleştirilmesi

Lenfositlerin maruziyet süresi sona erdiğinde tüpler inkübatörden alınmış ve 2000rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant atılmış pellet üzerine 0.075M'lık hipotonik solüsyonu eklenmiş ve 3 dakika boyunca oda ısısında tutulmuştur. Sonrasında 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant atılmış pellet üzerine yavaşça 5 birim asetik asit 3 birim metanolden oluşan birinci fiksatif eklenmiştir. 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında süpernatant atılmış pellet üzerine metanol eklenmiştir. Santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüpün içerisindeki solüsyon berraklaşınca kadar 3 birim metanol 1 birim asetik asitten oluşan karnoy fiksatif eklenmiştir. Fikse edilen lenfositler temiz lamlara yayılmıştır. Yayma işleminden sonra ilk olarak hücreler 1XPBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra 1XPBS/%0,3 Triton X-100 ile oda ısısında bloke edilmiştir. 1XPBS ile yıkanmıştır. Primer antikor (1:100 PBS/Triton) ile +4° de inkübe edilmiştir. Daha sonra oda ısısında sekonder antikor (1:100 PBS/Triton) ile inkübe edilmiştir. Lamlar 1XPBS ile yıkandıktan sonra 3-4 damla DAPI ile boyanıp konfokal mikroskopta incelenmiştir.

3.2.6. Seryum dioksit'in SEM'de karakterizasyonu

Nanopartiküllerin etkileri, onların partikül büyüklüğüne bağlı olarak farklılık gösterdiğinden, çalışmalara başlamadan önce partikül boyutunun belirlenmesi amacıyla seryum dioksit partikülleri taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. Toz halinde Sigma'dan temin edilen seryum dioksit nanopartikülleri ölçüm işlemi için tutucuya yapıştırılmıştır. Daha sonra örnekler platinle kaplanmıştır. Örnekler hazırlandıktan sonra SEM'de incelenmiştir (Şekil 1. Seryum dioksit nanopartiküllerinin SEM'deki görüntüsü).



Şekil 3.2. Seryum dioksit nanopartiküllerinin SEM'deki görüntüsü.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney protokolleri sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde verilerin dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakılmıştır. Veriler normal dağılım gösterdiği için tanımlayıcı istatistiklerde ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. İki'den fazla grubu olan bağımlı değişkenlerin analizinde Repeated Measures Anova (tekrarlanan ölçümlü varyans analizi), iki grubu olan bağımlı değişkenlerin analizinde ise Paired Samples t testi kullanılmıştır. Anlamlılık

düzeyi 0,05 ve <0,0001 olarak alınmıştır. Paket programda SPSS 11.5'den yararlanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Spirotetramat'ın Genotoksik Etkileri

Spirotetramat tarım alanlarında istenmeyen böceklerin kontrolünde kullanılan tetramik asit türevi yeni bir insektisittir. İnsanlar bu insektisite uygulama sırasında ve besin zinciri aracılığı ile maruz kalmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda insanların maruz kalabileceği düşünülen ve literatürde yer alan 25µg/mL, 50µg/mL ve 75µg/mL'lik üç doz deneyler sırasında kullanılmak üzere belirlenmiştir. Çalışmalar sırasında sigara alkol kullanmayan sağlıklı 4 erkek ve 4 dişi bireyden alınan lenfositler kullanılmıştır.

4.1.1.1. Mikronukleus verileri

Spirotetramat ile 48 saat ve 72 saat muamele edilmiş kültürlerde mikronukleus oluşumu önemli derecede artmıştır (Çizelge 4.1.). 48 saat ve 72 saatlik maruziyet sonucunda elde edilen mikronukleus değerleri karşılaştırıldığında zamana bağlı olarak aradaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (P=0,001). Zamana bağlı olarak farklılığa bakıldığında; 25µg/mL'lik dozun 48 saatlik maruziyeti sonucunda elde edilen değerle, yine aynı dozun 72 saatlik maruziyeti sonucunda elde edilen değer arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0,0001). Aynı istatistiksel önem 50µg/mL'lik dozun 48 ve 72 saatlik maruziyeti sonunda da elde edilmiştir. 75µg/mL'lik dozun süreler arasındaki farkı değerlendirildiğinde ise aradaki fark P=0,01 seviyesinde anlamlı bulunmuştur. Test edilen tüm dozlarda mikronukleus oranında artış meydana geldiği gözlemlense de en yüksek mikronukleus oranı 75µg/mL'lik dozun 72 saat maruziyeti sonucunda elde edilmiştir.

Spirotetramat ile 48 saat ve 72 saat muamele edilen kültürlerde tüm konsantrasyonlarda CBPI kontrole nazaran önemli derecede düşmüştür (Çizelge 4.1.). Muamele süresinde CBPI'daki düşüş konsantrasyona bağlı bir durum sergilemiştir. Doz ve maruziyet süresi arttıkça CBPI değeri düşmüştür. 75µg/mL spirotetramat'a 48 saat maruziyet sonunda elde edilen CBPI değeri ile pozitif kontrol grubunun 48 saatlik değeri benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak spirotetramat'ın test edilen tüm dozlarının neden olduğu mikronukleus oluşumu negatif kontrolle karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. CBPI değeri ise negatif kontrolden daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Spirotetramat maruziyetine ait mikronukleus ve CBPI değerleri.

DOZ	Mikronukleus		CBPI	
	48 Saat	72 Saat	48 Saat	72 Saat
Negatif Kontrol	1,00±0,76 ^{ab}	1,63±0,52 ^{ab}	1,69±0,01 ^a	1,66±0,01 ^a
Çözücü Kontrol	2,50±0,76 ^{*a}	2,75±0,70 ^{*a}	1,67±0,014 ^a	1,6563±0,03 ^a
Pozitif Kontrol	21,00±1,51 ^{*b}	20,75±1,28 ^{*b}	1,19±0,01 ^{*b}	1,09±0,05 ^{*b}
25µg/mL	6,62±0,92 ^{*ab}	7,87±1,13 ^{*ab}	1,38±0,01 ^{*ab}	1,30±0,05 ^{*ab}
50µg/mL	9,63±1,19 ^{*ab}	11,88±1,13 ^{*ab}	1,28±0,01 ^{*ab}	1,23±0,02 ^{*ab}
75µg/mL	13,75±2,60 ^{*ab}	15,88±1,36 ^{*ab}	1,19±0,02 ^{*b}	1,15±0,01 ^{*ab}

“*” Negatif kontrol ile olan karşılaştırmalar P<0.0001

“a” Pozitif kontrol ile olan karşılaştırmalar P<0.0001

“b” Çözücü kontrol ile olan karşılaştırmalar P<0.0001

4.1.1.2. Komet verileri

Spirotetramat'ın 25µg/mL, 50µg/mL ve 75µg/mL'lik dozlarına 48 ve 72 saat boyunca maruz bırakılan insan periferik kan lenfositlerinde yapılan analizler sonucunda periferik kan lenfositlerinde belirlenen hasarlı hücre sayısı (%), hasarlı hücre (%) ve genetik hasar indeksi Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Buna göre, spirotetramat'ın 25, 50 ve 75 µg/mL'lik dozları her iki uygulama periyodu boyunca da negatif kontrolle karşılaştırıldığında hasarlı hücre yüzdesinde ve genetik hasar indeksinde zamana ve doza bağlı olarak anlamlı derecede yükselmelere neden olmuştur (P<0.05=a, P<0.001=b). Bununla birlikte en yüksek genetik hasar indeksi 72 saatlik maruziyet sonrasında en yüksek doz olan 75µg/mL'lik dozda meydana gelmiştir. Buna göre 72 saatlik maruziyet sonunda kontrol grubundaki genetik hasar indeksi 0.55±0.03 iken bu oran 25µg/mL, 50µg/mL ve 75µg/mL'lik dozlarda sırasıyla 0.97±0.06, 1.23±0.10 ve 1.43±0.09 olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol

olarak kullanılan hidrojen peroksit, negatif kontrol grubuna oranla uygulama süresinde genetik hasar indeksinde anlamlı düzeyde artışa yol açmıştır ($P<0.001=b$). Spirotetramat için çözücü olarak kullanılan etanol kontrol grubunda negatif kontrol grubuna oranla bir miktar artış olduğu görülmekle birlikte bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.



Çizelge 4.2. Spirotetramat maruziyetine ait komet bulguları.

Maruziyet Dozu	Maruziyet Süresi	Hasarlı Hücre Sayısı (%)					Hasarlı Hücre (%)	Genetik Hasar İndeksi
		T0	T1	T2	T3	T4		
NK	48	77.12±1.32	12.50±1.52	3.00±0.56	2.50±0.50	4.87±1.04	10.37±1.42	0.45±0.04
	72	72.87±2.65	14.50±2.39	4.25±0.79	1.12±0.39	7.25±0.81	12.62±0.80	0.55±0.03
ÇK	48	75.12±2.32	11.87±1.70	4.50±1.10	2.12±0.51	6.37±1.48	13.00±2.07	0.52±0.06
	72	68.87±4.54	16.75±3.35	5.87±1.45	2.12±0.69	6.37±1.29	14.37±2.53	0.60±0.08
PK	48	1.50±1.48	1.50±0.63	1.00±0.80	20.50±0.69	75.50±1.48	97.00±0.08by	3.67±0.03by
	72	1.00±1.82	3.00±2.23	3.00±1.10	9.00±1.70	83.00±0.80	95.00±0.80by	3.68±0.79by
25µg/mL	48	66.87±2.16	12.50±1.87	7.50±1.18	3.87±0.63	9.25±1.58	20.62±1.52a	0.76±0.05
25µg/mL	72	56.37±3.23	18.50±2.61	8.12±2.21	5.00±0.80	11.87±2.23	25.00±1.96	0.97±0.06ab
50µg/mL	48	57.12±1.82	17.12±1.66	7.87±1.66	5.00±0.88	12.87±1.46	25.75±1.93bx	0.99±0.05x

‘Çizelge 4.2. (devamı)’

50µg/mL	72	48.75±2.80	18.75±2.69	10.00±2.11	5.12±1.04	17.37±2.98	32.50±3.65a	1.23±0.10a
75µg/mL	48	53.50±2.51	17.87±1.85	9.25±1.88	4.50±0.70	14.87±2.81	28.62±4.04a	1.09±0.11x
75µg/mL	72	39.75±3.95	20.12±1.99	13.50±3.08	10.37±2.16	16.25±1.48	40.12±4.24ax	1.43±0.09bx

NK: Negatif Kontrol ÇK:Çözücü Kontrol(etanol %0.05) PK:Pozitif Kontrol(Hidrojen Peroksit)

NK ile karşılaştırıldığında $P<0.05=a$, $P<0.001=b$ ÇK ile karşılaştırıldığında $P<0.05=x$, $P<0.001=y$

4.1.2. Seryum dioksit'in Genotoksik Etkileri

Seryum dioksit boyalarda, kozmetikte, cilalamada ve temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan nanopartiküllerdendir. Bu nanopartikülün genotoksitesisi ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bu nedenle literatürde kullanılan dozlar ve insanların maruz kaldığı dozlar göz önünde bulundurularak seryum dioksit'in üç farklı konsantrasyonunun insan lenfosit kültürü üzerindeki genotoksik etkileri araştırılmıştır.

4.1.2.1. Mikronukleus verileri

Seryum dioksit'in neden olduğu mikronukleus oluşumları insan periferik lenfositlerinin 24 saatlik maruziyeti sonrasında değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular pozitif kontrol ile 6µg/mL'lik en düşük dozdan elde edilen mikronukleus bulguları arasında fark olmadığını göstermiştir. 12µg/mL ve 18µg/mL'lik seryum dioksit konsantrasyonunun maruziyeti sonrasında ise pozitif kontrol değerlerini de aşan mikronukleus bulguları elde edilmiştir. Bu iki dozdan da 18µg/mL'lik dozda mikronukleus oluşumu daha yüksek gözlenmiştir. Paralel şekilde CBPI değerinde ise düşüş meydana gelmiştir. 6µg/mL'lik muamelede mikronukleus oluşumu pozitif kontrol ile benzerlik gösterirken CBPI değerinde anlamlı farklılık meydana geldiği gözlenmiştir (Çizelge 4.3.).

Sonuç olarak seryum dioksit'in test edilen tüm konsantrasyonları mikronukleus oluşumunu arttırmıştır. Ayrıca 18µg/mL ve 12µg/mL'lik dozların pozitif kontrolden daha yüksek frekansta mikronukleus oluşumuna neden olduğu elde edilmiştir.

Çizelge 4.3. Seryum oksit'e ait mikronukleus ve CBPI değerleri.

Doz	Mikronukleus(%)	CBPI(%)
	Ortalama \pm Standart sapma	Ortalama \pm standar sapma
Negatif Kontrol	1,00 \pm 0,76 ^a	2,08 \pm 0,05 ^a
Pozitif Kontrol	11,25 \pm 1,03*	0,89 \pm 0,01*
6μg/mL	10,00 \pm 1,31*	1,19 \pm 0,01** ^a
12μg/mL	15,00 \pm 1,30** ^a	1,16 \pm 0,01** ^a
18μg/mL	18,87 \pm 1,12** ^a	1,13 \pm 0,02** ^a

“a” Pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında P<0.0001

“*” Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında P<0.0001

4.1.2.2. Komet verileri

Seryum dioksit'in farklı dozlarına 3 saat boyunca maruz bırakılan insan periferik kan lenfositlerinden elde edilen hasarlı hücre sayısı (%), hasarlı hücre (%) ve genetik hasar indeksi Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir. Buna göre, seryum dioksit'in 6, 12 ve 18 μ g/mL'lik dozlarına 3 saatlik maruziyet sonunda elde edilen bulgular negatif kontrole karşılaştırıldığında hasarlı hücre yüzdesinde ve genetik hasar indeksinde doza bağlı olarak anlamlı derecede yükselmeler olduğu gözlemlenmiştir (P<0.05=a, P<0.001=b). Bununla birlikte en yüksek hasarlı hücre yüzdesi 30.62 \pm 3.40 ile 18 μ g/mL'lik dozda meydana gelmiştir. Bu oranı 25.87 \pm 2.00 ile orta doz ve 19.75 \pm 2.78 ile düşük doz takip etmiştir. Genetik hasar indeksinde de benzer durum söz konusudur. En yüksek genetik hasar 1.19 \pm 0.11 ile yüksek dozda gözlemlenmiştir. Bu oranı ise sırasıyla orta doz ve düşük doz grupları takip etmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan hidrojen peroksit maruziyeti sonrasında hem hasarlı hücre yüzdesinin hem de genetik hasar indeksinin değerleri negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir (P<0.001=b).

Çizelge 4.4. Seryum oksit maruziyetine ait komet bulguları.

Maruziyet Dozu	Maruziyet Süresi	Hasarlı Hücre Sayısı (%)					Hasarlı Hücre (%)	Genetik Hasar İndeksi
		T0	T1	T2	T3	T4		
NK	3 Saat	71.62±2.28	15.25±1.27	3.00±0.53	2.12±0.54	8.00±1.52	13.12±1.93	0.59±0.07
ÇK	3 Saat	68.87±1.88	16.62±1.58	4.75±1.34	2.75±0.59	7.00±0.98	14.50±1.53	0.62±0.04
PK	3 Saat	25.87±2.15	20.62±2.07	10.62±1.19	12.25±1.23	30.37±0.80	53.25±1.76 by	2.00±0.04 by
6µg/mL	3 Saat	60.25±3.28	20.00±2.25	6.50±1.25	2.62±0.41	10.62±1.79	19.75±2.78	0.83±0.08
12µg/mL	3 Saat	51.12±3.66	23.00±2.85	10.75±1.87	3.37±0.62	11.75±1.90	25.87±2.00 x	1.01±0.07 ax
18µg/mL	3 Saat	45.87±2.80	23.50±2.55	10.62±1.53	4.87±0.98	15.12±2.86	30.62±3.40 ax	1.19±0.11 ax

NK: Negatif Kontrol ÇK:Çözücü Kontrol(steril su) PK:Pozitif Kontrol(Hidrojen Peroksit)

NK ile karşılaştırıldığında P<0.05=a, P<0.001=b ÇK ile karşılaştırıldığında P<0.05=x, P<0.001=y

4.1.2.3. Gama H2AX verileri

Seryum dioksit'in üç farklı dozuna 24 saat maruz bırakılan lenfositlere gama H2AX testi uygulanmıştır. Uygulama sonrasında her bireye ait 100 hücre sayılarak değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Hücredeki ışına sayıları bize hasarın derecesini belirtmiştir. Buna göre negatif kontrolde en fazla 3-4 ışına gözlemlenirken bu sayı pozitif kontrol ve doz gruplarında daha yüksek bulunmuştur. En düşük doz grubu olan 6µg/ml'lik gruplarda ışına 6-9 arasında değişirken, 12µg/ml'lik dozda bu sayı 8-12 arasında değişkenlik göstermiştir. 18µg/ml'lik doz grubunda bu sayı bazı hücrelerde 8 iken bazılarında sayılamayacak kadar çok olmuştur. Pozitif kontrol grubunda ise ışına sayısı 18-25 arasında değişkenlik göstermiştir.

Çizelge 4.5. Seryum dioksit maruziyetine ait gama H2AX bulguları.

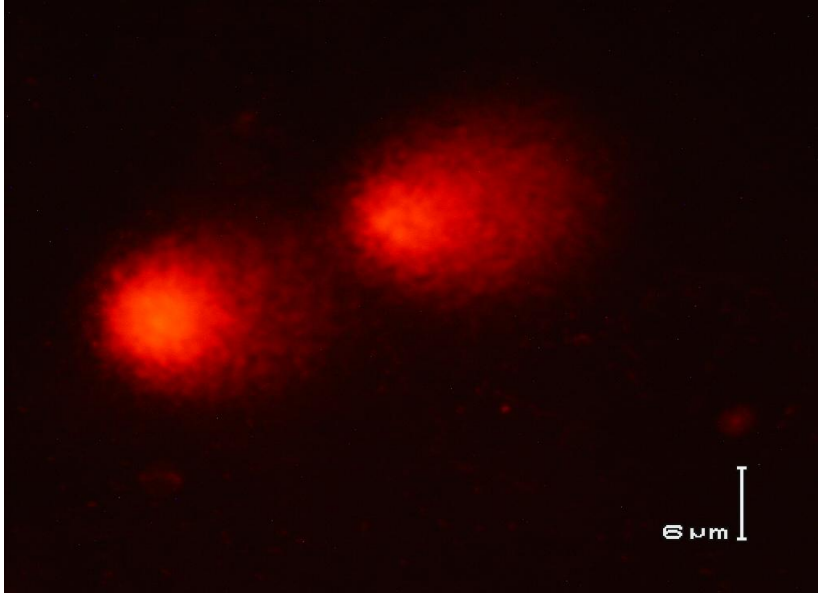
Grup	Konsantrasyon	Gama Işınası ± S. H
Negatif Kontrol	-	2.12 ± 0.35
Pozitif Kontrol	100µM	20.37 ± 0.80*
Seryum dioksit	6 µg/ml	7.75 ± 0.36*
Seryum dioksit	12 µg/ml	10.25 ± 0.52*
Seryum dioksit	18 µg/ml	33.50 ± 0.82*

“*” Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında P<0.0001

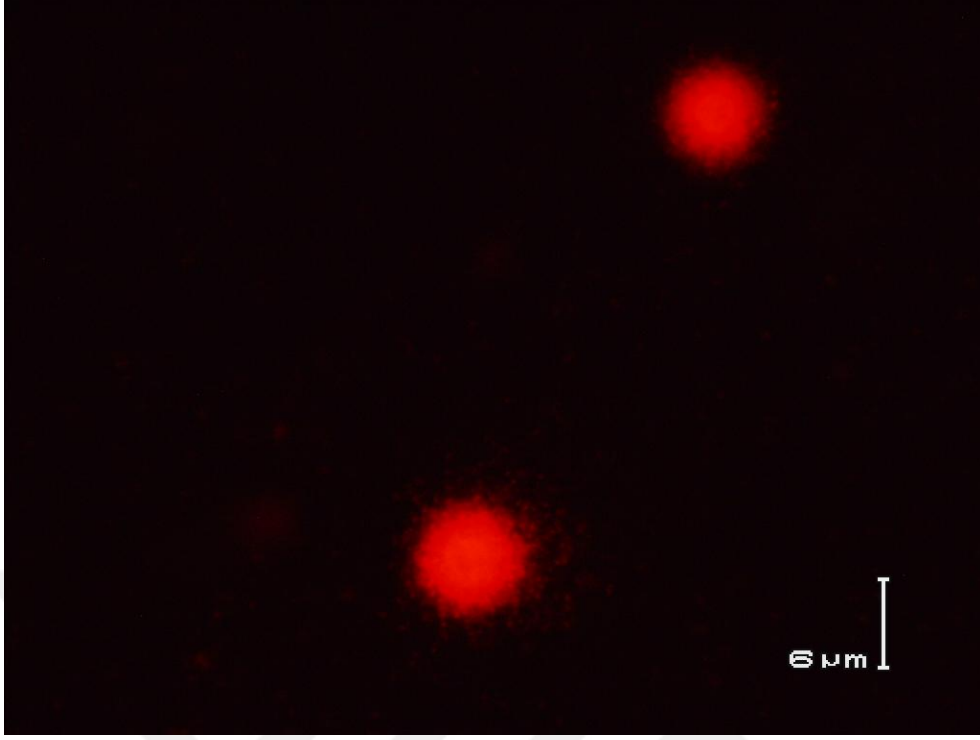
Spirotetramat ve seryum dioksite maruz bırakılan insan periferik kan lenfositlerinde belirlenen çeşitli mikronukleus, komet ve gama H2AX oluşumlarının örnekleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. İnsan lenfosit hücrelerinde Tip 0 komet görüntüleri.



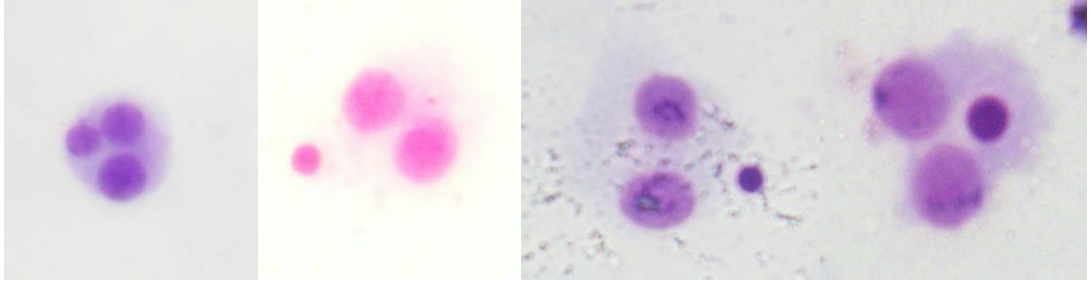
Şekil 4.2. İnsan lenfosit hücrelerinde Tip 3 komet görüntüleri.



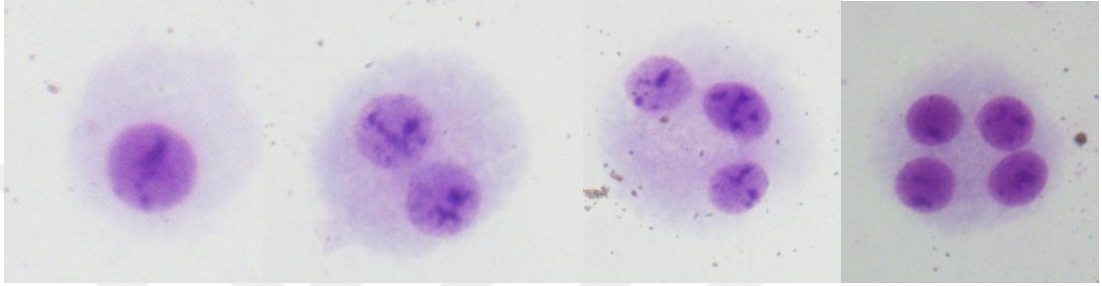
Şekil 4.3. İnsan lenfositlerinde Tip 1 Tip 0 komet görüntüleri.



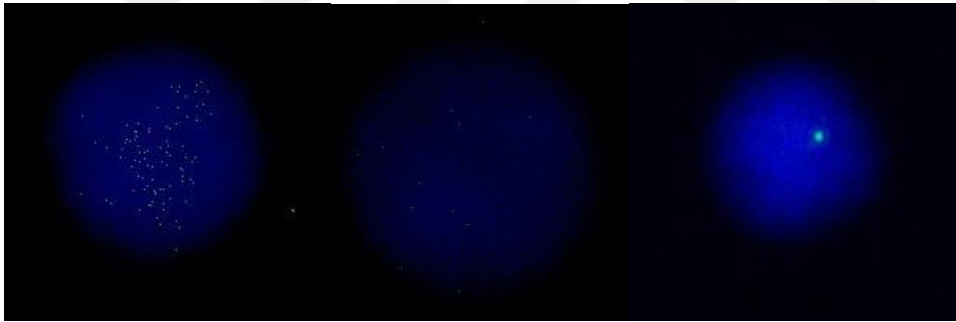
Şekil 4.4. İnsan lenfositlerinde Tip 4 komet görüntüsü.



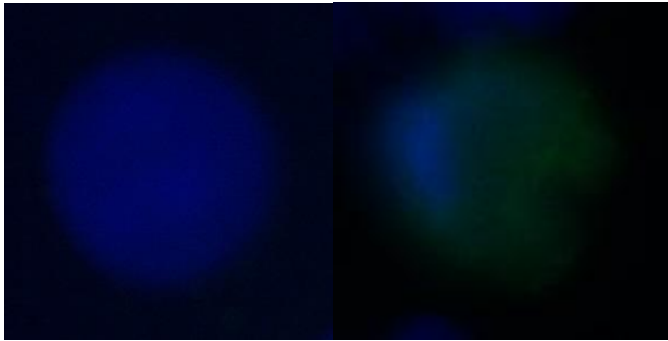
Şekil 4.5. İnsan lenfositlerinde binukleuslu hücrede mikronukleus görüntüsü.



Şekil 4.6. Tek nukleuslu, iki nukleuslu, üç nukleuslu ve dört nukleuslu lenfosit görüntüsü.



Şekil 4.7. Gama H2AX ışınması gösteren lenfosit hücreleri.



Şekil 4.8. Gama H2AX ışınması vermeyen hasarsız lenfosit ve ışınma veren hasarlı lenfosit.

4.2. TARTIŞMA

Dünyada çeşitli amaçlarla gün geçtikçe artan pestisit kullanımı ve teknolojinin gelişmesiyle artan nanopartikül içerikli ürünler, doğada kimyasal kirlenmeye neden olmaktadır. İnsanlarda bu kimyasallara direkt veya dolaylı yollardan maruz kalmaktadır. Bu maruziyet insanların genlerinde meydana gelebilecek ve dölden döle aktarılabilecek olumsuz bir mutasyon oluşturabilir ve bu mutasyon türün yok olmasıyla sonuçlanabilir. Bu nedenle canlıların genetik materyallerinin korunması önemlidir. Bu yüzden doğada bulunan ve insanların direkt ya da dolaylı olarak maruz kaldıkları ajanların, genetik materyallerinde meydana getirdiği hasarı belirlemek gen havuzunu korumak adına önemlidir. Son yıllarda bu amaçla yapılan çalışmaların çoğunda insan lenfosit kültürü kullanılmaktadır.

Pestisitlerin genotoksik etkilerinin laboratuvar ortamında test edilmesinde insan lenfositlerinin etkin şekilde kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Kumar Srivastava ve arkadaşları [2012], kemiricilerde tümöre ve genotoksik etkiye neden olduğu bilinen mankozep fungusinin genotoksitesini insan lenfosit kültüründe mikronukleus ve kromozomal aberasyon testini kullanarak değerlendirmişler ve mankozep'e maruz kalan insan popülasyonunun potansiyel risk altında olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışma da Sandal ve Yılmaz [2011], yapısal olarak farklı dört pestisit insan sağlığı üzerine etkilerini insan lenfosit kültüründe komet tekniği ile değerlendirmişler ve genetik hasarın arttığını bildirmişlerdir. Calderon-Segura ve arkadaşları [2012], ticari neonikotinoid insektisitlerden dört tanesinin (kalipso, ponko, gauçi, jade) genotoksik ve sitotoksik etkisini alkalik komet testi ve tripan blu dye exclusion testini kullanarak insan lenfosit kültüründe değerlendirmişlerdir. Graillot ve arkadaşları [2012], Fransa'da tüketicilerin yiyeceklerdeki pestisit kalıntılarına maruziyeti sonrasında meydana gelebilecek hasarı farklı hücre hatlarında 14 farklı pestisiti kullanarak, genotoksikite belirlemede yeni olan gama H2AX testi ile araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar pestisitlerin insan hücre hattında genotoksik hasara neden olduğunu göstermiştir. Pestisit araştırmalarının yanı sıra nanopartikül çalışmalarında da insan lenfosit kültürünün kullanılabildiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Mesela Apoorva ve arkadaşları [2013], gümüş ve titanyum dioksit nanopartiküllerinin genotoksik etkisini

mikronukleus, kromozom aberasyonu ve kromozom poliploidi statüsünü değerlendirerek bildirmişlerdir. Maruziyet sonrasında da genotoksik etkinin arttığını belirtmişlerdir. Bundan başka Taner ve arkadaşları [2014], klobetasol -17-propionatlı ve propionatsız lesitin/çitosan nanopartiküllerinin genotoksisite ve sitotoksitesini komet ve mikronukleus testini kullanarak insan periferik lenfositlerinde değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, genotoksisite belirlemelerinde insan lenfosit hücrelerinin iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma da çevresel kirlenmelerden olan ve son yıllarda yoğun şekilde kullanılan spirotetramat ve seryum dioksit'in insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etkisini belirlemek üzere farklı test yöntemleri uygulanmıştır.

Spirotetramat emici böceklerin kontrolünde kullanılan tetramik asit türevi olan yeni bir insektisittir. Bu çalışmada spirotetramat'ın gıdalardaki kalıntı miktarı ve daha önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak belirlenen konsantrasyonlarına 48 ve 72 saat boyunca maruz kalan insan lenfosit kültüründe mikronukleus ve genetik hasar indeksinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Spirotetramat'ın insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik etkileri henüz çalışılmamış olmakla birlikte, spirotetramat ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* bazı çalışmalar şunlardır;

Spirotetramat ile ilgili 2008 yılına kadar yapılmış beş adet *in vitro* ve üç adet *in vivo* genotoksisite çalışması mevcuttur. 2008 yılına kadar gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaları Herbold yapmıştır [Pesticide residues in food — 2008]. Herbold farklı yıllarda Salmonella ırklarında reverse mutasyon testini kullanarak, çin hamster hücrelerinde kromozom aberasyon testini kullanarak ve çin hamster akciğer hücrelerinde forward mutasyon testini kullanarak genotoksisiteyi incelemiştir. Çin hamster hücrelerinde yaptığı kromozom aberasyon testinde zayıf pozitif sonuçlar bulmuştur. Burada Herbold spirotetramat'ın 10-50µg/mL(S9'suz ortam)'lik ve 20-80µg/mL(S9'lu ortam)'lik konsantrasyonunu kullanmıştır.

In vivo çalışmaları ise yine Herbold, fare kemik iliğinde mikronukleus testi ve kromozom aberasyon testini kullanarak gerçekleştirmiştir. Brendler-Schwaab ise rat

hepatositlerinde unscheduled DNA sentezini kullanarak genotoksisiteyi değerlendirmiştir. *In vivo* genotoksisite çalışmalarının üçüde negatif sonuç vermiştir.

Bu çalışmaların dışında spirotetramat'a direkt maruz kalan böcek ve çeşitli bitkilerde de toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Test edilen bazı canlılarda spirotetramat'ın toksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada spirotetramat'ın mikronukleus frekansları doz-süre bazında karşılaştırıldığında; doza ve süreye bağlı olarak mikronukleus frekansının arttığı gözlenmiştir. CBPI değerinde ise doza bağlı olarak düşüş olduğu gözlenmiştir.

Yaptığımız bu tez çalışmasında spirotetramat'ın genotoksisitesi ölçülmüştür. Elde edilen veriler spirotetramat'ın test edilen dozlarının insan periferik lenfosit hücrelerinde genotoksik hasara sebep olduğunu göstermiştir. Ek olarak CBPI parametresindeki düşük spirotetramat'ın sitotoksik etkisi olduğunu işaret etmektedir. Yapılan diğer genotoksisite çalışmaları ile karşılaştırıldığı zaman elde edilen bulgular arasında farklılık vardır. Fakat bizim sonuçlarımız, Herbold'un çin hamster hücrelerinde 20-80µg/mL'lik konsantrasyonda gerçekleştirdiği genotoksisite değerlendirmesinde elde ettiği zayıf pozitif sonuçların gerçekte pozitif olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sayısal değerler arasında farklılıkların bulunması uygulanan doz miktarı, maruziyet süresi, maruz bırakılan hücre tipi, deneylerin yapıldığı laboratuvar koşullarının farklı olması gibi değişkenlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Seryum dioksit kozmetiklerde, tıpta, cilalamada ve projektörlerde bulunan nanopartiküllerdendir. Bu çalışmada seryum dioksit'in insan bünyesinde bulunan konsantrasyon göz önünde bulundurularak belirlenen konsantrasyonlarına 3 ve 24 saat boyunca maruz kalan insan lenfosit kültüründe mikronukleus ve genetik hasar indeksinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Seryum dioksit maruziyet süreleri yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir. Maruziyet süresi arttıkça canlı hücre oranında azalış meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle komet testi sırasında lenfositler seryum dioksit'e üç saat boyunca maruz bırakılmıştır. Fakat mikronukleus değerlendirmesinin yapılabilmesi için hücrenin

mutlaka bölünme geçirmesi gerektiğinden mikronukleus maruziyeti 24 saat olarak belirlenmiştir.

Seryum dioksit ile ilgili çeşitli hücre hatlarında yapılmış *in vitro* çalışmalar ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Burada şüpheye düşülen söz konusu olay seryum dioksit'in bazı çalışmalarda genotoksik etki gösterdiği bazı çalışmalarda ise anti genotoksik özellik gösterdiği. İnsan lenfosit hücre kültüründe yapmış olduğumuz çalışma, seryum dioksit'in genotoksik etki gösterdiğini belirten çalışmalarla benzer sonuçlar göstermiştir.

Barbara ve arkadaşları [2012] insan lens epitel hücrelerinde nanocerianın maruziyet süresi (48 ve 72 saat) ve yüksek doz (10, 20 ve 100µg/mL) uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. 48 saatlik maruziyet süresi sonunda 100µg/mL'lik konsantrasyonda genotoksik etki gözlemlenmemişlerdir. 72 saatlik maruziyet sonrasında elde edilen veriler de küçük de olsa anlamlı farklılıklar elde etmişlerdir. Sonuç olarak seryum oksitin konsantrasyonundan ziyade maruziyet süresinin genotoksik etkiye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Lopez-Moreno ve arkadaşları [2010], CeO(2) ve ZnO nanopartiküllerine maruz bırakılan fasulye bitkilerinde, bu partiküllerin genotoksitesine ve biyotransformasyonuna bakmışlardır. Gerçekleştirdikleri genotoksikite testi sonrasında ise CeO₂ nanopartiküllerinin fasulye bitkilerinde genotoksik olduğunu göstermişlerdir.

Srinivas ve arkadaşları [2011], ratlarda burun yoluyla seryum oksit nanopartikülüne maruziyetten sonra potansiyel akut toksisiteyi değerlendirmişlerdir. Ratları 24 saat, 48 saat ve 14 gün boyunca 15-30nm büyüklüğündeki seryum oksit nanopartiküllerine maruz bırakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda hücre canlılığında anlamlı oranda azalma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Solunum yoluyla seryum oksit nanopartiküllerinin akut maruziyeti sonrasında oksidatif strese bağlı olarak sitotoksikite meydana gelebileceği ve kronik inflamator cevap başlayabileceğini belirtmişlerdir.

Hussain ve Garantziotis [2013], çevresel ve medikal olan nanometal seryum dioksit nanopartikülü ile maruziyetten sonra insan monositlerinde apoptoz ve otofaji

arasındaki etkileşimi araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgulara göre seryum dioksit nanopartikülünün, öncül ölüm mekanizmasına etki ederek otofajiye neden olduğu ve insan monositlerinde sitotoksisiteyi yükseltmeye başladığını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak bazı çalışmalar, seryum dioksit'in antijenotoksik etkiye sahip olduğunu belirtmesine rağmen bizim çalışmamızda test edilen seryum oksit konsantrasyonları negatif kontrol ve pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında genotoksik bulunmuştur. Garcia ve Hussain'in çalışmaları da bizim çalışmamızı desteklemektedir. Garcia çok düşük dozlarda dahi seryum oksit'in toksik etki göstereceğini belirtmiştir. Hussain ve Garantziotis ise seryumoksit'in monositlerde sitotoksik etkiye neden olduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak seryum oksitin toksik etkisinin dozdan ziyade maruziyet süresiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamız da uyguladığımız komet testi bunu doğrulamaktadır. Komet testinin sonuçlarına baktığımızda en yüksek dozda meydana gelen hasarlı hücre yüzdesi pozitif kontrolde meydana gelen hasarlı hücre yüzdesinden düşükken, mikronukleus verilerine baktığımızda en yüksek seryum konsantrasyonunda meydana gelen mikronukleus sayısının pozitif kontrolden daha yüksek olduğu gözlenmektedir [Garcia vd., 2010; Hussain ve Garantziotis, 2013].

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre spirotetramat ve seryum dioksit maruziyetine bağlı olarak, artan dozlarda insan lenfosit kültürlerinde genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesinde artış görülmüştür ($p < 0,05$). Aynı şekilde artan dozlara bağlı olarak mikronukleus frekansında da artış meydana gelmiştir. Gerçekleştirilen tüm test sistemlerinden elde edilen değerler birbirini destekler nitelikte bulunmuştur. Seryum dioksit'e 24 saat maruz bırakılan lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilen gama H2AX testinden elde edilen sonuçlar da mikronukleus verileriyle ve komet verileriyle benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamız, üç test (mikronukleus, komet testi ve gama H2AX testi) sisteminde de *in vitro* lenfosit hücre kültüründe spirotetramat ve seryum dioksit'in test edilen doz aralıklarında genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak lenfosit hücrelerinde, *in vitro* genotoksisite araştırmalarında gama H2AX testinin kullanılabileceği gösterilmiştir.

- ✓ Spirotetramat ve seryum dioksit ile gerçekleştirilen *in vitro* genotoksisite belirleme çalışması, *in vivo* çalışmalar ile desteklenmelidir.
- ✓ Her iki kimyasala da mesleki maruziyet söz konusu olduğundan, bu tarz iş yerlerinde kişisel koruyucu ekipman kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. Halk sağlığını koruma anlamında bilgilendirme yapılmalıdır.
- ✓ Spirotetramat'ın tarımsal alanlarda kontrollü kullanımı sağlanmalıdır. Bu konuda çiftçilere hektar başına kullanabilecekleri maksimum dozlar önerilmelidir.
- ✓ Gıdalardaki pestisit kalıntı miktarlarının düzenli aralıklarla ölçülmesi sağlanmalıdır.
- ✓ Nanopartikül içeren ürünler (temizlik ürünleri, boya, kozmetik vb.) gerekli genotoksisite testlerinden geçtikten sonra piyasaya sürülmelidir.

- ✓ Nanopartiküllerin genotoksik etki gösterme özelliği, etki ettiği hücrenin pH aralığına göre farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle nanopartiküller tıpta kullanılırken hedef hücredeki pH aralığı göz önünde bulundurulmalıdır.
- ✓ Genotoksisite araştırmalarında gama H2AX testi oldukça etkin sonuçlar vermektedir. Test sistemlerinde H2AX uygulamalarının yaygınlaştırılması önemlidir.
- ✓ Genotoksisiteye neden olan kimyasal ajanların belirlenmesinde tezde kullanılan üç test yönteminin de birlikte kullanılması güvenilir sonuçlar almak açısından çok önemlidir.



KAYNAKLAR

- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J. ve Hong, Y., “DNA Damage Response To Different Surface Chemistry Of Silver Nanoparticles In Mammalian Cells”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233:404–410, (2008).
- Agbohessi, P.T., Imorou Toko, I., Houndji, A., Gillardin, V., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., “Acute Toxicity of Agricultural Pesticides to Embryo-Larval and Juvenile African Catfish *Clarias gariepinus*”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:692–700 (2013).
- Al-Nsour, F., Hussain, S., Rice, A.B., Marshburn, J., Ji, Z., Zink, J.I., Yingling, B., Walker, N.J., Garantzotis, S., “Cerium dioxide nanoparticles do not modulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes”, *International Journal of Nanomedicine*, 7: 1387–1397(2012).
- Amr, M.M., “Pesticide monitoring and its health problems in Egypt, a Third World country”, *Toxicology Letters*, 107:1–13, (1999).
- Antisari, L.V., Carbone, S., Gatti, A., Vianello, G., Nannipieri, P., “Toxicity of metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil”, *Soil Biology & Biochemistry*, 60 :87-94 (2013).
- Apoorva, G., Lavanya, K., Vidisha, Pavani, Kumar, R.R., Hasan, Q. ve Ramakrishna, D., “Genotoxic effects of silver and titanium dioxide nanoparticles”, *Advanced Nanomaterials and Emerging Engineering Technologies (ICANMEET)*, International Conference, 24-26 July, (2013).
- Asha Rani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P. ve Valiyaveetil, S., “Cytotoxicity And Genotoxicity Of Silver Nanoparticles In Human Cells”, *American Chemical Society Nano*, 3:279–290, (2009).
- Atlı-Şekeroğlu, Z., “Nanoteknolojiden Nanogenotoksikolojiye: Kobalt-Krom Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisi”, *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(1): 33-42, (2013).

- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., Chaneac, C., Olivi, L., Berge-Lefranc, J.L., Botta, A., Wiesner, M.R. ve Bottero, J.Y., “In Vitro Interactions Between Dmsacoated Maghemite Nanoparticles And Human Fibroblasts: A Physicochemical And Cyto-Genotoxic Study”, *Environmental Science & Technology*, 40:4367–4373, (2006).
- Auffan, M., Rose, J., Orsiere, T., Meo, M.D., Thill, A., Zeyons, O., Proux, O., Masion, A., Chaurand, P., Spalla, O., Botta, A., Wiesner, M.R. ve Bottero, J.Y. “CeO₂ nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts *in vitro*”, *Nanotoxicology*, 3(2): 161-171, (2009).
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M.R. ve Bottero, J.Y., “Chemical Stability Of Metallic Nanoparticles: A Parameter Controlling Their Potential Cellular Toxicity *In Vitro*”, *Environmental Pollution.*, 157:1127–1133, (2009).
- Barbara, K., Pierscionek, PhDa., YuebinLi, PhD., Ronald, A.S., MD, PhD., Wei, C., PhD., “The effect of high concentration and exposure duration of nanoceria on human lens epithelial cells”, *Nanomedicine:Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8:383-390, (2012).
- Barbosa, A. ve Bonin, A.M., “ Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales”, *Australia, Occupational and Environmental Medicine*, 51 :700–705, (1994).
- Benedetti, D., Nunes, E., Sarmento, M., Porto, C., Santos, C.E.I., Dias, J.F. ve Silva, J., “ Genetic Damage In Soybean Workers Exposed To Pesticides: Evaluation With The Comet And Buccal Micronucleus Cytome Assays”, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 752:1-2, 28-33, (2013).
- Bhattacharya, K., Davoren, M., Boertz, J., Schins, R.P., Hoffmann, E. ve Dopp, E., “Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress And DNA-Adduct Formation But Not DNA-Breakage In Human Lung Cells”, *Particle and Fibre Toxicology*, 6:17, (2009).

- Bolognesi, C., “Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies”, *Mutation Research*, 543:251–272, (2003).
- Brusick, D. “Principles of genetic toxicology”, Plenum Press New York, USA, 284p, (1987).
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y. ve Collins, A. R. “*In vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *In vivo* Comet Assay Workgroup”, *Mutation Research*, 627(1), 31–5, (2007).
- Calderon-Segura, M. E., Gomez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martinez-Valenzuela, C., Carbajal-Lopez, Y., Calderón-Ezquerro, M. C., Cortes-Eslava, J., Garcia-Martinez, R., Flores-Ramirez, D., Rodríguez-Romero, M. I., Mendez-Perez, P. ve Banuelos-Ruiz, E., “Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Effects in Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Neonicotinoid Insecticides News”, *Journal of Toxicology*, (2012).
- Calvert, G.M., Talaska, G., Mueller, C.A., Ammenheuser, M.M., Au, W.W., Fajen, J.M., Fleming, L.E., Briggles, T. ve Ward, E., “Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide”, *Mutation Research*, 417:115–128, (1998).
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L. ve Myers, M.S. “An assessment of the piscine micronucleus test as an *in-situ* biological indicator of chemical contaminant effects”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 2723-2136, (1990).
- Chen, X.D. ve Stark, J.D., “Individual- and population-level toxicity of the insecticide, spirotetramat and the agricultural adjuvant, Destiny to the Cladoceran, *Ceriodaphnia dubia*”, *Ecotoxicology*, 19:1124–1129, (2010).
- Cheng, G., Guo, W., Hana, L., Chen, E., Kong, L., Wang, L., Ai, W., Song, N., Li, H. ve Chen, H., “Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways”, *Toxicology in Vitro*, 27:1082–1088, (2013).

Collins, A.R. “The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations”, *Molecular Biotechnology*, 26, 249–60, (2004).

Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, COM guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, United Kingdom, December, (2000).

Çavaş, T. “Endüstriyel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronükleus ve AgNOR Analiz Teknikleri Kullanılarak *İn-Situ* ve Laboratuvar Koşulları Altında Araştırılması”, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Çiftlikköy kampüsü, Mersin, (Ocak-2004).

Çavas, T., Cinkilic, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D. ve Coskun, M., “*In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and cH2AX foci assays”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104:212–217, (2012).

Çelik, A., Ekinci, S.Y., Guler, G. Ve Yildirim, S., “*In Vitro* Genotoxicity Of Fipronil Sister Chromatid Exchange, Cytokinesis Block Micronucleus Test, And Comet Assay”, *DNA And Cell Biology*, 33:3, 148-154, (2014).

Dağ, S.S., Aykaç, V.T., Gündüz, A., Kantarcı, M. ve Şişman, N. “Türkiyede tarım ilaçları endüstrisi ve geleceği” ,

ERİŞİM: <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/5tk02/40.pdf> 06.05.2007

Das, S., Singh, S., Dowding, J.M., Oommen, S., Kumar, A., Sayle, T.X., Saraf, S., Patra, C.R., Vlahakis, N.E., Sayle, D.C., Self, W.T. ve Seal, S., “The Induction Of Angiogenesis By Cerium Oxide Nanoparticles Through The Modulation Of Oxygen In Intracellular Environments”, *Biomaterials*, 33:7746–7755, (2012).

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. “Türkiyede pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları” Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre.

ERİŞİM: <http://www.agr.ege.edu.tr/~guncan/pdf/2005tzmtk.pdf>
06.04.2007

Dickey, J.S., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Baird, B.J., Sedelnikova, O.A. ve Bonner, W.M., “ H2AX: functional roles and potential applications”, *Chromosoma*, 118:683–692, (2009).

Di Virgilio, A.L., Reigosa, M., Arnal, P.M. ve Fernandez Lorenzo De Mele, M., “Comparative Study Of The Cytotoxic And Genotoxic Effects Of Titanium Oxide And Aluminium Oxide Nanoparticles In Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) Cells”, *Journal of Hazardous Materials*, 177:711–718, (2010).

Dufour, E.K., Kumaravel, T., Nohynek, G.J., Kirkland, D. ve Toutain, H., “Clastogenicity, Photo-Clastogenicity Or Pseudo-Photo-Clastogenicity: Genotoxic Effects Of Zinc Oxide In The Dark, In Pre-Irradiated Or Simultaneously Irradiated Chinese Hamster Ovary Cells”, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607:215–224, (2006).

Dwivedi, S., Saquib, Q., Al-Khedhairi, A.A. Ve Musarrat, J., “Butachlor Induced Dissipation Of Mitochondrial Membrane Potential, Oxidative DNA Damage And Necrosis In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells”, *Toxicology*, 302:1, 77-87, (2012).

EPA, “United States Environmental Protection Agency”, Summary of Analytical Chemistry and Residue Data Spirotetramat, (2008).

Erişim: http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-392201_17-Apr-08_a.pdf

Falck, G.C., Lindberg, H.K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., Savolainen, K. ve Norppa, H., “Genotoxic Effects Of Nanosized And Fine Tio2”, *Human Experimental Toxicology*, 28:339–352, (2009).

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. ve Nussenzweig, A., “H2AX: the histone guardian of the genome”, *DNA Repair*, 3: 959–967, (2004).

Figgs, L.W., Titenko-Holland, N., Rothman, N., Zahm, S.H., Tarone, R.E., Hill, R., Vogt, R.F., Smith, M.T., Boysen, C.D., Holmes, F.F., VanDyck, K. ve Blair, A., “Increased lymphocyte replicative index following 2,4-

- dichlorophenoxyacetic acid herbicide exposure”, *Cancer Causes Control*, 11: 373–380, (2000).
- Gaiser, B.K., Fernandes, T.F., Jepson, M.A., Lead, J.R., Tyler, C.R., Baalousha, M., Biswas, A., Britton, G.J., Cole, P.A., Johnston, B.D., Ju-Nam, Y., Rosenkranz, P., Scown, T.M. ve Stone, V., “Interspecies Comparisons On The Uptake And Toxicity Of Silver And Cerium Dioxide Nanoparticles”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:1, 144–154, (2012).
- Garaj-Vrhovac, V. ve Zeljezic, D., “Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in workers employed in pesticide production”, *Biologia*, 54 :707–712, (1999).
- Garaj-Vrhovac, V. ve Zeljezic, D., “ Cytogenetic monitoring of Croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides”, *Toxicology*, 165: 153–162, (2001).
- Garaj-Vrhovac, V. ve Zeljezic, D., “Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by Chromosomal aberration analysis micronucleus assay and comet assay”, *Journal of Applied Toxicology*, 22: 249–255, (2002).
- Garcia, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., Gonzalez, E., Puentes, V., Barata, C., Font, X., Sanchez, A., “Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests”, *Desalination*, 269:136-141(2010).
- Garry, V.F., Griffith, J., Danzl, T.J., Nelson, R.L., Whorton, J.E.B., Krueger, L. ve Cervenka, J., “Human genotoxicity: pesticide applicators and phosphine”, *Science*, 246 :251–255, (1989).
- Garry, V.F., Danzl, T.J., Tarone, R., Griffith, J., Cervenka, J., Krueger, L., Whorton, J.E.B. ve Nelson, R.L., “Chromosome rearrangements in fumigant applicators: possible relationship to non-Hodgkin’s lymphoma risk”, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1: 287–291, (1992).
- Gedik, C. M. ve Collins, A. “ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocytes DNA: results of an interlaboratory

- validation study”, Federation of American Societies for Environmental Biology Journal, 19(1), 82–4, (2005).
- Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I. ve Schins, R.P.F., “Cytotoxicity And Oxidative DNA Damage By Nanoparticles In Human Intestinal Caco-2 Cells”, Nanotoxicology, 3:355–364, (2009).
- Giri, S., Karakoti, A., Graham, R.P., Maguire, J.L., Reilly, C.M., Sea, S., Rattan, R. ve Shridhar, V., “Nanoceria: A Rare-Earth Nanoparticle as a Novel Anti-Angiogenic Therapeutic Agent in Ovarian Cancer”, Plos One, 1:8, (2013).
- Gopalan, R., Osman, I., Amani, A., Matas, M. ve Anderson, D., “The Effect Of Zinc Oxide And Titanium Dioxide Nanoparticles In The Comet Assay With UVA Photoactivation Of Human Sperm And Lymphocytes”, Nanotoxicology, 3:33–39, (2009).
- Graillet, V., Tomasetig, F., Cravedi, J. P. ve Audebert, M., “Evidence of the *in vitro* genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides in human cells”, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 748: 1-2, 8-16, (2012).
- Gurr, J.R., Wang, A.S.S., Chen, C.H. ve Jan, K.Y., “Ultrafine Titanium Dioxide Particles In The Absence Of Photoactivation Can Induce Oxidative Damage To Human Bronchial Cells”, Toxicology, 213:66–73, (2005).
- Hackenberg, S., Friehs, G., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Scherzed, A., Burghartz, M. ve Kleinsasser, N., “Nanosized Titanium Dioxide Particles Do Not Induce DNA Damage In Human Peripheral Blood Lymphocytes”, Environmental and Molecular Mutagenesis, 52:264–268, (2011a).
- Hackenberg, S., Zimmermann, F.Z., Scherzed, A., Friehs, G., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R. ve Kleinsasser, N., “Repetitive Exposure To Zinc Oxide Nanoparticles Induces DNA Damage In Human Nasal Mucosa Mini Organ Cultures”, Environmental and Molecular Mutagenesis, 52:582–589, (2011c).

- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B. ve Clay, P. “Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, Mutagenesis”, 18, 45–51, (2003).
- Hillegass, J.M., Shukla, A., Lathrop, S.A., MacPherson, M.B., Fukagawa, N.K. ve Mossman, B.T., “Assessing nanotoxicity in cells *in vitro*”, John Wiley & Sons, Inc. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2 :219–231, (2010).
- Hirst, S.M., Karakoti, A., Singh, S., Self, W., Tyler, R., Seal, S., Reilly, C.M., “Bio-distribution and *in vivo* antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice”, Environmental Toxicology, 107-119 (2011).
- Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S. ve Iwahashi, H., “*In Vitro* Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles”, Chemical Research in Toxicology, 25, 605–619, (2012).
- Hu, J., Wang, C., Wang, J., You, Y. ve Chen, F., “Monitoring of resistance to spirodiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards”, Pest Management Science, 66(9):1025-1030 (2010).
- Hussain, S., Al-Nsour, F., Rice, AB., Marshburn, J., Yingling, B., Ji, ZX., Zink, JI., Walker, NJ. ve Garantzotis, S., “Cerium Dioxide Nanoparticles Induce Apoptosis and Autophagy in Human Peripheral Blood Monocytes”, American Chemical Society NANO, 6 (7) : 5820-5829, (2012).
- Hussain, S. ve Garantzotis, S. “Interplay between apoptotic and autophagy pathways after exposure to cerium dioxide nanoparticles in human monocytes”, Autophagy, 9 (1) :101-103, (2013).
- Jablonika, A., Polakova, H., Karelova, J. ve Vargova, M., “Analysis of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of workers with occupational exposure to the mancozeb containing fungicide Novozir Mn80”, Mutation Research, 224: 143–146, (1989).
- Joksic, G., Vidakovic, A. ve Spasojevic-Tisma, V., “Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers”, Environmental Research, 75: 113–118, (1997).
- Kaioumova, D.F. ve Khabutdinova, L.K., “Cytogenetic characteristics of herbicide production workers in Ufa”, Chemosphere, 37: 1755–1759, (1998).

- Kang, S.J., Kim, B.M., Lee, Y.J. ve Chung, H.W., “Titanium Dioxide Nanoparticles Trigger P53-Mediated Damage Response In Peripheral Blood Lymphocytes”, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 49:399–405, (2008).
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. ve Moller, L., “Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison Between Metal Oxide Nanoparticles And Carbon Nanotubes”, *Chemical Research Toxicology*, 21:1726–1732, (2008a).
- Karlsson, S., Modin, J., Becker, H.C., Hammarstrom, L. ve Grennberg, H., “How Close Can You Get? Studies Of Ultrafast Lightinduced Processes In Ruthenium-[60] Fullerene Dyads With Short Pyrazolino And Pyrrolidino Links”, *Inorganic Chemistry*, 47:7286–7294, (2008b).
- Karlsson, H.L., Gustafsson, J., Cronholm, P. ve Moller, L., “Sizedependent Toxicity Of Metal Oxide Particles—A Comparison Between Nano- And Micrometer Size”, *Toxicology Letters*, 188:112–118, (2009).
- Karlsson, H.L., “The comet assay in nanotoxicology research”, *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 398:651–666, (2010).
- Kassie, F., Parzefall, W. ve Knasmu, S. “Single-cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies”, *Mutation Research*, 463(1), 13–31, (2000).
- Kataeva, M., Kotseruba, V., Terekhina, N., Kutlunina, N. ve Beljaeva, A. “Allium Root-Micronucleus (Allium-MCN) Test on the Genotoxicity of Soil Samples Contaminated with Heavy Metals”, *World Applied Sciences Journal*, 17:8, 992-1000, (2012).
- Kılıç, S., “Çevre Sorunları ve Yoksulluk”, *Uluslararası Alanya İşletme Fakültesi Dergisi*, 5:1(9-20), 2013.
- Kim, I.S., Baek, M. ve Choi, S.J., “Comparative Cytotoxicity Of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ And ZnO Nanoparticles To Human Lung Cells”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10:3453–3458, (2010).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, M., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles,

- J., Vanhauwaert, An ve Wakata, A., “Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”, Mutation Research, 540:153–163, (2003).
- Kocaman, A.Y. ve Topaktas, M., “The *In Vitro* Genotoxic Effects of a Commercial Formulation of alpha-Cypermethrin in Human Peripheral Blood Lymphocytes”, Environmental And Molecular Mutagenesis, 50:1, 27-36, (2009).
- Kocataş, “Ekoloji ve Çevre Biyolojisi”, Ege Üniv., Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:51.V. Baskı, Bornova-İzmir, Sayfa:442-443, (1991).
- Konczol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., Treude, F., Gminski, R., Giere, R., Grobety, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I. ve Mersch-Sundermann, V., “Cytotoxicity And Genotoxicity Of Size-Fractionated Iron Oxide (Magnetite) In A549 Human Lung Epithelial Cells: Role Of ROS, JNK, And NF-Kappab”, Chemical Research in Toxicology, 24:1460–1475, (2011).
- Kosmider, B., Osiecka, R. ve Scinski, J.T., “Micronucleus Assay in Plants to Monitor Environmental Pollution *In Situ*”, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 17:6-2, (2000).
- Kourakis, A., Mouratidou, M., Kokkinos, G., Barbouti, A., Kotsis, A., Mourelatos, D. ve Dozi-Vassiliades, J., “Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses”, Mutation Research, 279: 145–148, (1992).
- Kourakis, A., Mouratidou, M., Barbouti, A. ve Dimikiotou, M., “Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers”, Carcinogenesis, 17:99–101, (1996).
- Kumar, A. ve Dhawan, A., “Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles:an update”, Archives of Toxicology, 87:1883–1900, (2013).
- Kumar Srivastava, A., Ali, W., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Al-Khedhairi, A., Kumar Srivastava, P., Musarrat, J. ve Shukla, Y., “Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes”, Life Sciences, 90:21-22, 815-824, (2012).
- Kumari, M., Singh, S.P., Chinde, S., Rahman, M.F., Mahboob, M., Grover, P., “Toxicity Study of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Neuroblastoma Cells”, International Journal of Toxicology, 1:2 (2014).

- Kuo, L.J. ve Yang, L.X., “ γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks”, *In vivo*, 22: 305-310, (2008).
- Lander, F. ve Ronne, M., “Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide-exposed greenhouse sprayers”, *Scandinavian Journal of Work, Environment&Health*, 21: 283–288, (1995).
- Laurent, C., Jadot, P. ve Chabut, C., “Unexpected decrease in cytogenetic biomarkers frequencies observed after increased exposure to organo-phosphorous pesticides in a production plant”, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 68: 399–404, (1996).
- Lee, S.W., Kim, S.M. ve Choi, J. “Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28 : 86–91, (2009).
- Linnainmaa, K., “ Sister chromatid exchanges among workers occupationally exposed to phenoxy acid herbicides 2,4-Dand MCPA”, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, 3:269–279, (1983).
- Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernandez-Viezcas, J.A., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R. ve Gardea-Torresdey, J.L., “Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO(2) Nanoparticles on Soybean (*Glycine max*) Plants”, *Environmental Science & Technology*, 44: 19: 7315-7320 (2010).
- Lord, M.S., Jung, M.S., Teoh,W.Y., Gunawan, C., Vassie, J.A., Amal, R., Whitelock, J.M., “Cellular uptake and reactive oxygen species modulation of cerium oxide nanoparticles in human monocyte cell line U937”, *Biomaterials*, 33 : 7915-7924(2012).
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O. ve Jeggo, P.A., “ γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization”, *Cell Cycle*, 9:4, 662-669, (2010).

- Ma, T.H. “*Tredescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening”, Environmental Health Perspective, 37: 85-90, (1981).
- Madle, S., Von der-Hude, W., Broschinski, L. ve Janig, G. “Threshold effects in genetic toxicity: perspective of chemicals regulation in Germany”, Mutation Research, 464(1) : 117-21, (2000).
- Mansour, S.A. “Pesticide exposure--Egyptian scene”, Toxicology, 198(1-3): 91-115, (2004).
- Marcic, D., Petronijevic, S., Drobnjakovic, T., Prijovic, M., Peric, P. ve Milenkovic, S., “The Effects Of Spirotetramat On Life History Traits And Population Growth Of Tetranychus Urticae (Acari: Tetranychidae)”, Experimental and Applied Acarology, 56:113–122, (2012).
- McCormack, C., “Public Release Summary on Evaluation of the new active Spirotetramat in the product Movento 240 SC Insecticide Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority”, National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, (2009).
- Midander, K., Cronholm, P., Karlsson, H.L., Elihn, K., Moller, L., Leygraf, C. ve Wallinder, I.O., “Surface Characteristics, Copper Release, And Toxicity Of Nano- And Micrometer-Sized Copper And Copper(II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study”, Small, 5:389–399, (2009).
- Moens, J., Clercq, P.D. ve Tirry, L., “Side effects of pesticides on the larvae of the hoverfly *Episyrphus balteatus* in the laboratory”, Phytoparasitica, 39(1):1-9 (2011).
- Mohapatra, S., Deepa, M. ve Jagadish, G.K., “ An Efficient Analytical Method for Analysis of Spirotetramat and its Metabolite Spirotetramat-Enol by HPLC”, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88:124-128 (2012).
- Mohammad, O., Walid, A.A. ve Ghada, K., “Chromosomal aberrations in human lymphocytes from two groups of workers occupationally exposed to pesticides in Syria”, Environmental Research, 70:24–29, (1995).
- Moller, P. “ Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay”, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 96, 1–42, (2005).

- Moller, P. “ The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures”, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(4), 336–45, (2006a).
- Muller, H.J. “Artificial transmutation of the gene”, *Science*, 66:84-87, (1927).
- Mustonen, R., Kangas, J., Vuojalahti, P. ve Linnainmaa, K., “Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*”, *Mutagenesis*, 1: 241–245, (1986).
- Nagy, K., Racz, G., Matsumoto, T., Adany, R. ve Adam, B., “Evaluation of the genotoxicity of the pyrethroid insecticide phenothrin”, *Mutation Research- Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 770:1-5, (2014).
- Nehez, M., Berencsi, G., Paldy, A., Selyes, A., Czeizel, A., Szentesi, I., Csanko, J., Levay, K., Maurer, J. ve Nagi, E., “Data on the chromosome examinations of workers exposed to pesticides”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1: 116–122, (1981).
- Nehez, M., Boros, P., Ferke, A., Mohos, J., Palotas, M., Vetro, G., Zimanyl, M. ve Desi, I., “Cytogenetic examination of people working with agrochemicals in the southern region of Hungary”, *Regulatory Toxicology*, 8: 37–44, (1988).
- Olive, P.L. ve Banath, J.P. “The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells”, *Nature Protocols*, 1(1), 23–9. (2001).
- Oliveira, M.S., Duarte, I.M., Paiva, A.V., Yunes, S.N., Almeida, C.E., Mattos, R.C., Sarcinelli, P.N., “The Role of Chemical Interactions Between Thorium, Cerium, and Lanthanum in Lymphocyte Toxicity”, *Archives of Environmental & Occupational Health*, 69:1:40-45 (2014).
- Osman, I.F., Baumgartner, A., Cemeli, E., Fletcher, J.N. ve Anderson, D., “Genotoxicity And Cytotoxicity Of Zinc Oxide And Titanium Dioxide In Hep-2 Cells”, *Nanomedicine*, 5:1193–1203, (2010).
- Ostling, O. ve Johanson, K.J. “Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–8, (1984).
- Ozkan, D., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. Ve Aksoy, H., “ Evaluation Of The Cytogenetic Damage Induced By The Organophosphorous Insecticide acephate”, *Cytotechnology*, 59:73-80, (2009).

- Özkaya, G., Çeliker, A. ve Koçer-Giray, B., “İnsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye’deki durumun değerlendirilmesi”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70:2, 75-102, (2013).
- Padmavathi, P., Prabhavathi, P.A. ve Reddy, P.P., “Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:155–160, (2000).
- Paldy, A., Puskas, K., Vincze, K. ve Hadhazi, M., “Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides”, *Mutation Research*, 187: 127–132, (1987).
- Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Angeli, G., Fatigoni, C., Monarca, S., Beneventi, L., Di Giulio, A.M. ve Bauleo, F.A., “Cytogenetic biomonitoring of pesticide exposed farmers in central Italy”, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 15:29–39, (1996).
- Pestisitlerin Sınıflandırılması, Erişim: <http://www.ziraattube.com/m/331/pestisitlerin-siniflandirilmasi.html>
- Pesticide Residues in Food-2008, Toxicological evaluations, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy, 9–18 September, (2008).
- Petkovic. J., Zegura, B., Stevanovic, M., Drnovsek, N., Uskokovic, D., Novak, S. ve Filipic, M., “DNA Damage And Alterations In Expression Of DNA Damage Responsive Genes Induced By TiO₂ Nanoparticles In Human Hepatoma HepG2 Cells”, *Nanotoxicology*, 5:341–353, (2011).
- Pierscionek, B.K., Li, Y., Yasseen, A.A., Colhoun, L.M., Schachar, R.A. ve Chen, W. “Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells”, *Nanotechnology*, 21:035102-8pp, (2010).
- Poma, A., Marzi, L.D., Monaco, A., Lapuente, J.D., Ramos, D., Borrás, M., Gioacchino, M.D., Santucci, S., “Cytotoxicity and Genotoxicity of Ceria Nanoparticles on Different Cell Lines in Vitro”, *International Journal of Molecular Sciences*, 14:3065-3077(2013).
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. ve Bonner, W., “Histone H2A variants H2AX and H2AZ”, *Current Opinion in Genetics & Development*, 12:162–169, (2002).

- Redon, C.E., Dickey, J.S., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A., “ γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin”, *Advances in Space Research*, 43:1171–1178, (2009).
- Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, O.A., Parekh, P.R., Weyemi, U.S. ve Bonner, W.M., “Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker”, *Aging*, 3:2, (2011).
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., “Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Rice: A Study Involving the Antioxidant Defense System and *In Vivo* Fluorescence Imaging”, *Environmental Science & Technology*, 47: 5635–5642(2013).
- Rita, P., Reddy, P.P. ve Reddy, S.V., “Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh”, *Environmental Research*, 44: 1–5, (1987).
- Rothen-Rutishauser, B., Grass, R.N., Blank, F., Limbach, L.K., Muhlfield, C., Brandenberger, C., Raemy, D.O., Gehr, P. ve Stark, W.J., “Direct Combination Of Nanoparticle Fabrication And Exposure To Lung Cell Cultures In A Closed Setup As A Method To Simulate Accidental Nanoparticle Exposure Of Humans”, *Environmental Science Technology*, 43:2634–2640, (2009).
- Rupa, D.S., Rita, P., Reddy, P.P. ve Reddi, O.S., “ Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers”, *Human Toxicology*, 7: 333–336, (1988).
- Rupa, D.S., Reddy, P.P. ve Reddi, O.S., “Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers”, *Mutation Research*, 223:253–258, (1989).
- Rupa, D.S., Reddy, P.P. ve Reddi, O.S., “Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of cotton field workers exposed to pesticides”, *Environmental Research*, 49:1–6, (1989).

- Rupa, D.S., Reddy, P.P. ve Reddi, O.S., “Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields”, *Mutation Research*, 22: 37–41, (1989).
- Rupa, D.S., Reddy, P.P., Sreemannarayana, K. ve Reddi, O.S., “Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticide applicators”, *Environmental Molecular Mutagenesis*, 18: 136–138, (1991).
- Rupa, D.S., Reddy, P.P. ve Reddi, O.S., “Clastogenic effect of pesticides in peripheral lymphocytes of cotton-field workers”, *Mutation Research*, 261:177–180, (1991).
- Sakhtianchi, R., Minchin, R.F., Lee, K.B., Alkilany, A.M., Serpooshan, V. ve Mahmoudi, M., “Exocytosis of nanoparticles from cells: Role in cellular retention and toxicity”, *Advances in Colloid and Interface Science*, 201–202, 18–29, (2013).
- Sandal, S. ve Yilmaz, B., “Genotoxic Effects Of Chlorpyrifos, Cypermethrin, Endosulfan And 2,4-D On Human Peripheral Lymphocytes Cultured From Smokers And Nonsmokers”, *Environmental Toxicology*, 26:5, 433-442, (2011).
- Scarpato, R., Migliore, L. ve Barale, R. “The micronucleus assay in *Anadonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenity”, *Mutation Research*, 245: 231-237, (1990).
- Scarpato, R., Castagna, S., Aliotta, R., Azzara, A., Ghetti, F., Filomeni, E., Giovannini, C., Pirillo, C., Testi, S., Lombardi, S. ve Tomei, A., “Kinetics of nuclear phosphorylation (γ -H2AX) in human lymphocytes treated *in vitro* with UVB, bleomycin and mitomycin C”, *Mutagenesis*, 28: 4 , 465–473, (2013).
- Sharma, V., Shukla, R.K., Saxena, N., Parmar, D., Das, M. ve Dhawan, A., “DNA Damaging Potential Of Zinc Oxide Nanoparticles In Human Epidermal Cells”, *Toxicology Letters*, 185:211–218, (2009).
- Sharma, V., Anderson, D. ve Dhawan, A., “Zinc Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress And Genotoxicity In Human Liver Cells (Hepg2)”, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7:98–99, (2011a).

- Sharma, V., Singh, S.K., Anderson, D., Tobin, D.J. ve Dhawan, A., “ Zinc Oxide nanoparticle Induced Genotoxicity In Primary Human Epidermal Keratinocytes”, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 11:3782–3788, (2011b).
- Shimizu, N., Itoh, H., Utiyama, H. ve Wahl, G.M. “Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase” , The Journal of Cell Biology, 140:1307-1320, (1998).
- Shukla, R.K., Sharma, V., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S. ve Dhawan, A., “ROS-Mediated Genotoxicity Induced By Titanium Dioxide Nanoparticles In Human Epidermal Cells”, Toxicology *In Vitro*, 25:231–241, (2011b).
- Shukla, R.K., Kumar, A., Gurbani, D., Pandey, A.K., Singh, S. ve Dhawan A., “Tio(2) Nanoparticles Induce Oxidative DNA Damage And Apoptosis In Human Liver Cells”, Nanotoxicology, 7:48–60, (2013).
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, Experimental Cell Research, 175(1), 184–91, (1988).
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J.S., Griffiths, S.M., Williams, P.M., Maffei, T.G.G., Wright, C.J., Doak, S.H., “NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials”, Biomaterials 30:3891–3914, (2009).
- Smiley, R.W., Marshall, J.M. ve Yan, G.P., “Effect of Foliarly Applied Spirotetramat on Reproduction of *Heterodera avenae* on Wheat Roots”, Plant Disease, 95:8 (2011).
- Speit, G. ve Hartmann, A. “ The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage”, Methods in Molecular Biology, 291, 85–95, (2005).
- Srinivas, A., Jaganmohan Rao, P., Selvam, G., Balakrishna Murthy, P. Ve Neelakanta Reddy, P. “Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats”, Toxicology Letters, 205:105-115, (2011).

- Steenland, K., Carrano, A., Ratcliffe, J., Clapp, D., Ashworth, L. ve Meinhardt, T., “ A cytogenetic study of papaya workers exposed to ethylene dibromide”, *Mutation Research*, 170: 151–160, (1986).
- Steenland, K., Cedillo, L., Tucker, J., Hines, C., Sorensen, K., Deddens, J. ve Cruz, V., “ Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis (dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico”, *Environmental Health Perspectives*, 105:126–1130, (1997).
- Taner, G., Yeşilöz, R., Vardar, D. Ö., Şenyiğit, T., Özer, Ö., Degen, G. H. ve Başaran, N., “Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of lecithin/chitosan nanoparticles”, *Journal of Nanoparticle Research*, 16: 2220, (2014).
- Theogaraj, E., Riley, S., Hughes, L., Maier, M. ve Kirkland, D., “An Investigation Of The Photo-Clastogenic Potential Of Ultrafine Titanium Dioxide Particles”, *Mutation Research*, 634:205–219, (2007).
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A. ve Kobayashi, H. “The single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206–21, (2000).
- Timoroglu, I., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. ve Celik, M., “Assessment of the genotoxic effects of organophosphorus insecticides phorate and trichlorfon in human lymphocytes”, *Environmental Toxicology*, 29:5, 577-587, (2014).
- Tiryaki, O., Canhilal, R. ve Horuz, S., “Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2): 154-169, (2010).
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinish, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. ve Smith, M.T., “Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers”, *Mutation Research*, 388: 85–95, (1997).
- “Toxicological Review Of Cerium Oxide and Cerium Compounds (CAS No. 1306-38-3) In Support of Summary Information on the Integrated Risk

- Information System (IRIS)”, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC, (2009).
- Tsaousi, A., Jones, E. ve Case, C.P., “The *In Vitro* Genotoxicity Of Orthopaedic Ceramic (Al₂O₃) And Metal (Cocr Alloy) Particles”, Mutation Research, 697:1–9, (2010).
- Turkez, H. ve Geyikoglu, F., “An *In Vitro* Blood Culture For Evaluating The Genotoxicity Of Titanium Dioxide: The Responses Of Antioxidant Enzymes”, Toxicology and Industrial Health, 23:19–23, (2007).
- Türküm, A.S., “Çağdaş Toplumda Çevre Sorunları ve Çevre Bilinci”, Anadolu Üniversitesi,(1990).
- Udroiu, I., “The Micronucleus Test For Aquatic Toxicology”, Aquatic Toxicology Research Focus, (Editör:Elias P. Svensson), Nova Science Publishes, New York, 145-160, (2008).
- United States Environmental Protection Agency Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, “Pesticide Fact Sheet Name of Chemical: Spirotetramat”, (2008).
- U.S. Environmental Protection Agency, “Toxicological Review Of Cerium Oxide and Cerium Compounds (CAS No. 1306-38-3) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)”, September (2009).
- Valdiglesias, V., Laffon, B., Pasaro, E. ve Mendez, J., “Evaluation Of Okadaic Acid-Induced Genotoxicity In Human Cells Using The Micronucleus Test And γ H2AX Analysis”, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 74:980–992, (2011).
- Venegas, W., Zapata, I., Carbonell, E. ve Marcos, R., “Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepcion, Chile”, Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis, 18:123–129, (1998).
- Vevers, W.F. ve Jha, A.N., “Genotoxic And Cytotoxic Potential Of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles On Fish Cells *In Vitro*”, Ecotoxicology (London, England), 17:410–420,(2008).
- Vural, N., “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, (2005).

- Wang, J.J., Sanderson, B.J. ve Wang, H., “Cyto- And Genotoxicity Of Ultrafine TiO₂ Particles In Cultured Human Lymphoblastoid Cells”, *Mutation Research*, 628:99–106, (2007).
- Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L. ve Sayes, C.M., “Development Of A Base Set Of Toxicity Tests Using Ultrafine TiO₂ Particles As A Component Of Nanoparticle Risk Management”, *Toxicology Letters*, 171:99–110, (2007).
- Waters, M.D., Stack, H.F., Brady, A.L., Lohman, P.H.M., Haroun, L. ve Vainio, H. “Use of computerized data listings and activity profiles of genetic and related effects in the review of 195 compounds”, *Mutation Research*, 205: 295-312, (1988).
- Watters, G.P., Smart, D.J., Harvey, J.S. ve Austin, C.A., “H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679:50–58, (2009).
- Wingard, C.J., Walters, D.M., Cathey, B.L., Hilderbrand, S.C., Katwa, P., Lin, S.J., Ke, P.C., Podila, R., Rao, A., Lust, R.M. ve Brown, J.M., “Mast cells contribute to altered vascular reactivity and ischemia-reperfusion injury following cerium oxide nanoparticle instillation”, *Nanotoxicology*, 5:4:531-545 (2011).
- Wise, J.P. Sr, Goodale, B.C., Wise, S.S., Craig, G.A., Pongan, A.F., Walter, R.B., Thompson, W.D., Ng, A.K., Aboueissa, A.M., Mitani, H., Spalding, M.J. ve Mason, M.D., “Silver Nanospheres Are Cytotoxic And Genotoxic To Fish Cells”, *Aquatic Toxicology*, 97:34–41, (2010).
- Wu, H.M., Yina, X.H., Jianga, S.J., Yub, J., Zhua, G.N., Mao, C.L., “Effects of spirotetramat on the acute toxicity, oxidative stress, and lipid peroxidation in Chinesetoad (*Bufo bufo gargarizans*) tadpoles”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37:1229–1235(2014).
- Xiang, G.G, Li, D.Q., Yuan, J.Z., Guan, J.M., Zhai, H.F., Shi, M.G., Tao, L.M., “Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction”, *Food And Chemical Toxicology*, 53:352-358, (2013).

- Xu, A., Chai, Y., Nohmi, T. ve Hei, T.K., “Genotoxic Responses To Titanium Dioxide Nanoparticles And Fullerene In Gpt Delta Transgenic MEF Cells”, *Part Fibre Toxicology*, 6:13,(2009).
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H. ve Xi, Z., “Comparative Study Of Cytotoxicity, Oxidative Stress And Genotoxicity Induced By Four Typical Nanomaterials: The Role Of Particle Size, Shape And Composition”, *Journal of Applied Toxicology*, 29:69–78, (2009).
- Yeni, D., Fidan, A.F. ve Gündoğan, M., “Spermatozoon’da Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24:3, 167-173, (2010).
- Yu, D-Y., Wang, C-F., Yu, Y., Huang, Y-O., Yao, J-A. ve Hu, J-F., “ Laboratory selection for spirodiclofen resistance and cross-resistance in *Panonychus citri*”, *African Journal of Biotechnology*, 10(17):3424-3429 (2011).
- Zeljezic, D. ve Garaj-Vrhovac, V., “Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to Pesticides”, *Mutagenesis*, 16: 359–363, (2001).
- Zeljezic, D. ve Garaj-Vrhovac, V., “Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides”, *Chemosphere*, 46: 295–303, (2002).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: SERPİL KÖNEN ADIGÜZEL

Doğum Tarihi: 15/04/1983

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen ve Matematik Alanı	Tarsus Cengiz Topel Lisesi	1997-2000
Lisans	Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2000-2014
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı(Tezli Yüksek Lisans)	Mersin Üniversitesi	2005-2007
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü OFMA Biyoloji Öğretmenliği (Tezsiz Yüksek Lisans)	Mersin Üniversitesi	2007-2008
Doktora	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2008- Devam Ediyor

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008-

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

Cavas, T. ve Könen, 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*, 90, 154-159, (2008).SCI

Könen, S. ve Cavas T. “Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test.”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 49, 434-438, (2008).SCI

Çavaş, T. ve **Könen, 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*, 22 (4): 263-268, (2007).SCI

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Ergene, S., Kaya, Ş., Dürgen, A., Uçar, A.H., Erkek, M., Ergene, M., **Könen Adıgüzel, S.**, Özbaba, O. ve Önder, H., "Mersin Rehabilitasyon Merkezinde Tedavi Altında Bulunan Yaralı Deniz Kaplumbağalarının Hematolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi", *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi* 3(2): 34-40, 2012.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Ergene, S., **Könen-Adıgüzel, S.** ve Kaya, Ş., “GENOTOXICITY TESTING OF THE INSECTICIDE SPIROTETRAMAT USING THE PISCINE MICRONUCLEUS TEST”, 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 15-18 Kasım 2012, ANTALYA.(Poster Bildiri)

Ergene, S., Kaya, Ş., Dürgen, A., Uçar, A.H., Erkek, M., Ergene, M., **Könen, S.**, Özbaba, O. ve Önder, H., "Mersin Yaralı Bakım Merkezinde Tedavi Altında Bulunan Deniz Kaplumbağalarının Hematolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi", IV. Ulusal Deniz Kaplumbağaları Sempozyumu, 11-13 Ekim 2012, ÇANAKKALE. (Poster Bildiri)

Çavaş, T ve **Könen, S.**, “Detection of cytogenetic and DNA damage in fish erythrocytes as in vivo markers of aquatic genotoxicity: The use of the micronucleus test and the comet assay”, 3. International Symposium, Genotoxicity in aquatic systems:Causes, effects and future needs, 22-24 September 2010, Freiburg im Breisgau, Germany.(Sözlü bildiri)

Könen, S., Çavaş, T.; “Askorbik Asitin *Oreochromis niloticus* Üzerindeki Antigenotoksik Etkilerinin Mikronükleus Testi Kullanılarak Araştırılması” , 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli(2010), S627, (Poster Bildirimi).

Tolga Çavaş ve **Serpil Könen** “Okadaik Asidin Balıklar Üzerindeki İn Vivo Genotoksik Etkilerinin *Oreochromis niloticus*'da Mikronükleus Testi ve Tek Hücre Jel Elektrozef (Komet) Testi Kullanılarak Araştırılması”,7. Uluslararası Katılımlı

Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 30 Mayıs-1 Haziran 2009, Sayfa 65. (Sözlü Bildiri).

Mazmancı, B., Çavaş, T., Mazmancı, M.A., **Könen, S.** ve Ünyayar, A. “Deltamethrine Maruz Bırakılan Ratlarda *Funalia trogii* Kültür Filtratının Koruyucu Etkisinin Mikronukleus ve Komet Testleri Kullanılarak Araştırılması”, 7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 30 Mayıs-1 Haziran 2009, Sayfa 75 (Poster Bildirimi).

Könen, S. ve Çavaş, T. “Herbisit treflan ve etken maddesi trifluralin’in genotoksik etkilerinin *Oreochromis niloticus* eritrositlerinde mikronükleus testi kullanılarak araştırılması”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.. 23-27 Haziran (2008), S631 (Poster Bildirimi).

Çavaş, T., Mazmancı, B. ve **Könen, S.**, “Zeytin Karasuyunun *Oreochromis niloticus* Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Eritrosit Mikronukleus Testi Kullanılarak Araştırılması”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 23-27 Haziran (2008), S584 (Poster Bildirimi).

Projelerdeki Görevi

“Çevresel Kirlenmelerin İnsan Lenfositleri Üzerine Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus, Komet, Gama H2AX Test Yöntemi İle Araştırılması” Başlıklı Doktora Tez Projesi. (**Araştırmacı**)