



**KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BAZI
İNSEKTİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN GİDERİLMESİ
İÇİN *PORTULACA OLERACEA* L. (SEMİZOTU) BİTKİSİNE
AİT ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARIN KULLANILMASI
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Halit KIZILET

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Handan UYSAL

2015

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BAZI İNSEKTİSİTLERİN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU
ETKİLERİN GİDERİLMESİ İÇİN *PORTULACA OLERACEA* L.
(SEMİZOTU) BİTKİSİNE AİT ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARIN
KULLANILMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Halit KIZILET

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BAZI İNSEKTİSİTLERİN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN GİDERİLMESİ İÇİN *PORTULACA
OLERACEA* L. (SEMİZOTU) BİTKİSİNE AİT ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARIN
KULLANILMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Prof. Dr. Handan UYSAL danışmanlığında, Halit KIZILET tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Handan UYSAL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Göksel TOZLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç:

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28.01./2016** tarih ve **5/24** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma **BAP** projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: **2011/112**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BAZI İNSEKTİSİTLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE BU ETKİLERİN GİDERİLMESİ İÇİN *PORTULACA OLERACEA* L. (SEMİZOTU) BİTKİSİNE AİT ÇEŞİTLİ EKSTRAKTLARIN KULLANILMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Halit KIZILET

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Handan UYSAL

Bu çalışmada tarımda üretim, saklama ve işleme aşamalarında sıklıkla kullanılan Bifentrin (BİF), Permetrin (PER), İmidakloprid (İMİ) ve Asetamiprid (ASE) insektisitlerinin genotoksik etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Genotoksik etkilerin giderilebilmesi için de *Portulaca oleracea* L. (Semizotu) bitkisine ait metanol (PO_{met}) ve su (PO_{su}) ekstraktları kullanılmıştır. *In vivo* test çalışmaları için *Drosophila melanogaster*'de Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART), *in vitro* test çalışmaları için de Kardeş Kromatid Değişim Testi (KKD) ve Mikronükleus Testi (MN) kullanılmıştır. SMART için *D. melanogaster*'in 3. evre trans-heterozigot larvaları dört farklı insektisit ile muamele edilerek erginleşen sineklerin kanat hücrelerindeki mutant trikomal incelenmiştir. KKD ve MN için ise insan periferik lenfosit kültürlerine yine farklı konsantrasyonlarda BİF, PER, İMİ ve ASE insektisitleri ilave edilmiştir. 72 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden yayma preparatlar hazırlanmış ve incelenmiştir. Ayrıca tüm testler için negatif kontrol olarak distile su ve insektisitlerin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO), pozitif kontrol olarak da etil metansülfonat (EMS) kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; SMART'da normal kanat fenotipi için, tüm insektisit uygulama gruplarında doz artışına bağlı olarak toplam klon sayıları ve buna bağlı mutasyon frekansında artış gözlenmiştir. Ancak kullanılan tüm insektisitlerin sadece en yüksek uygulama gruplarında (7ppm BİF, 8ppm PER, 2ppm İMİ ve ASE) sonuçlar anlamlı bulunmuştur (P<0,05). *In vitro* testlerde ise tüm insektisit uygulama grupları için (50-500 ppm BİF, PER, İMİ ve 25-250 ppm ASE) MN ve KKD sayılarında artış gözlenmiştir (P<0,05). Çalışmanın ikinci aşamasında, SMART için besiyerine insektisitlerin en yüksek uygulama gruplarıyla beraber %1 PO_{met} ve %1 PO_{su} ayrı ayrı eklenerek semizotunun antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. KKD ve MN için ise insektisitlerin en yüksek uygulama grupları ve kendisi kadar PO_{met} ve PO_{su} (1:1 / v:v) besiyerine beraber eklenerek antigenotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Bitkisel ekstraktlara bağlı olarak tüm testlerde, insektisit uygulama gruplarında gözlenen mutasyon frekanslarında istatistiksel olarak önemli düşüş gözlenmiştir (P<0,05). Sonuç olarak; SMART'da insektisitlere bağlı mutasyon artışı, *in vitro* testlerde ise kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansında gözlenen artış, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca PO_{met} ve PO_{su} ile bu hasarların giderilmesi, semizotunun kuvvetli bir antigenotoksik ajan olabileceğini göstermektedir.

2015, 155 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, insan periferik lenfosit hücreleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus, genotoksisite, insektisit, *Portulaca oleracea*, antigenotoksisite

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE STUDY OF DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SOME INSECTICIDES BY SHORT TERM TEST METHODS AND ELIMINATION OF THESE EFFECTS BY USING SEVERAL EXTRACTS OF *PORTULACA OLERACEA* L. (PURSLANE) PLANT

Halit KIZILET

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Handan UYSAL

In this study, we aimed to determine the genotoxic effects of Bifenthrin (BIF), Permethrin (PER), Imidacloprid (IMI) and Acetamiprid (ACE) insecticides, which are frequently used in agricultural manufacturing, storage and cultivation, in *in vivo* and *in vitro* environment. In order to eliminate genotoxic effects, we used methanol (PO_{met}) and water (PO_{wtr}) extracts of *Portulaca oleracea* L. (Purslane). We utilized Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* for *in vivo* and Sister Chromatid Exchange (SCE) and Micronucleus Test (MN) for *in vitro* studies. The 3rd stage trans-heterozygous larvae of *Drosophila melanogaster* were treated by four different insecticide for SMART and the mutant trichoms in wing cells of matured flies were studied. The different concentrations of BIF, PER, IMI and ACE insecticides were added to human peripheral lymphocyte cultures for SCE and MN tests. The smears from cultures incubated for 72 hours were prepared and studied. Additionally, in all tests, distilled water and a solvent of insecticides, dimethyl sulfoxide (DMSO), were used as negative controls, and ethyl methanesulfonate (EMS) was used as a positive control. An increase in the number of total clone spots and mutation frequency was observed as a result of the increase in the dosage of insecticides in all application groups for normal wing phenotype in SMART. However, the statistically significant results were found only in the groups treated by highest dosage of insecticides (7ppm BIF, 8ppm PER, 2ppm IMI ve ASE) (P<0,05). *In vitro* tests showed an increase in the frequencies of MN and SCE in all insecticide application groups (50-500 ppm BIF, PER, IMI ve 25-250 ppm ASE) (P<0,05). In the second stage of the study, the antigenotoxic effect of purslane was studied by adding 1% PO_{met} and 1% PO_{wtr} individually into groups with highest insecticide application for SMART. The antigenotoxicity studies were also performed by adding equal amount of PO_{met} and PO_{wtr} with insecticides (1:1/v:v) into the groups with highest insecticide application for SCE and MN. The addition of herbal extracts in all tests was shown to cause a statistically significant decrease in mutation frequency in each insecticide application group (P<0,05). As a result of our study, the increase in mutations in SMART, and SCE and MN in *in vitro* tests, respectively, can be assumed as a marker of damage in genetic material. Additionally, the repair of this damage by PO_{met} and PO_{wtr} indicates that purslane can be a strong antigenotoxic agent.

2015, 155 pages

Keywords: *Drosophila melanogaster*, somatic mutation and recombination test, human peripheral lymphocyte cells, micronucleus, sister chromatid exchange, genotoxicity, insecticides, *Portulaca oleracea*, antigenotoxicity

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarında yapılmış ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından “Bazı İnsektisitlerin Genotoksik Etkileri ve *Portulaca oleracea* L. Bitkisine Ait Ekstraktların Antigenotoksik Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı (BAP–2011/112) nolu projesi olarak desteklenmiştir.

Başta, bu çalışmanın planlama ve gerçekleştirme aşamalarında değerli katkı, öneri ve desteklerini hiç esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Handan UYSAL’a,

Çalışmanın gerçekleştirildiği Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genetik Araştırma Laboratuvarının tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığı’na,

Bu çalışmanın deneysel prosedürle ilgili yapıcı eleştirileri ve katkılarından dolayı tez izleme komitesi üyelerim Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR ve Prof. Dr. Göksel TOZLU’ya,

Bitki ekstraktlarının hazırlanma aşamasında teknik destekleri için Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ’ye,

Kromozom analizlerinde fikir ve önerileri ile laboratuvar koşullarının oluşturulmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Abdulgani TATAR’a,

Tezimin tüm aşamalarında bana destek ve yardımcı olan laboratuvar çalışma arkadaşlarım; Caner KASIMOĞLU ve Sedat ÜNVER’e,

Son olarak, bu tezin hazırlanması sürecinde ve yaşamım boyunca her türlü destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana manevi olarak desteklerini sürekli hissettiren Anneme, Babama, eşim Nergis KIZILET’e ve oğlum Yaman Rüzgar KIZILET’e,

Teşekkür ederim.

Halit KIZILET

Aralık, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. İnsektisitler	4
1.1.1. Piretroidler	4
1.1.1.a. Bifentrin	5
1.1.1.b. Permetrin	6
1.1.2. Neonikotinoidler	7
1.1.2.a. İmidakloprid	8
1.1.2.b. Asetamiprid	9
1.2. Genetik Toksikoloji	11
1.2.1. Genetik toksikolojide kullanılan bazı test teknikleri	12
1.2.1.a. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	13
1.2.1.b. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi	14
1.2.1.c. Mikronükleus (MN) testi	17
1.3. Bitkisel Ekstraktlar Kullanılarak Genotoksisitenin Giderilmesi	19
1.3.1 Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. <i>İn vivo</i> ve <i>in vitro</i> testlerde kullanılan kimyasal maddeler	39
3.1.2. İnsektisitler	41
3.1.3. SMART’da kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler	42
3.1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> ’in sistematigi	44
3.1.5. <i>Drosophila melanogaster</i> ’in hayat döngüsü	45
3.1.6. SMART’da kullanılan <i>Drosophila</i> mutant ırklarının genetik yapısı	46

3.1.7. <i>In vitro</i> KKD ve MN için donör seçimi ve kan örneklerinin alınması.....	48
3.1.8. Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.) bitkisinin toplanması	48
3.1.9. Semizotu metanol (PO _{met}) ekstraktının hazırlanması	50
3.1.10. Semizotu su (PO _{su}) ekstraktının hazırlanması	50
3.1.11. Genotoksisite testlerinde kullanılan çözeltiler ve tamponlar	51
3.1.12. <i>In vivo</i> somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)	52
3.1.13. <i>In vitro</i> kardeş kromatid değişim testi (KKD)	61
3.1.14. <i>In vitro</i> mikronükleus testi (MN)	63
3.2. Yöntem	64
3.2.1. SMART'da çaprazlama için birey seçimi	64
3.2.2. SMART için insektisitlerin LD ₅₀ ve LD ₁₀₀ değerlerinin belirlenmesi	64
3.2.3. İnsektisit çözeltilerinin ve bitki ekstraktlarının hazırlanarak larvalara uygulanması	64
3.2.4. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	66
3.2.5. Kanat preparatlarının mikroskopik analizi	67
3.2.6. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması	68
3.2.7. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi	69
3.2.8. <i>In vitro</i> kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması	69
3.2.9. KKD preparatlarının hazırlanması	70
3.2.10. KKD preparatlarının boyanması ve daimi preparatların hazırlanması	71
3.2.11. KKD Preparatlarının mikroskopik incelemesi	71
3.2.12. <i>In vitro</i> mikronükleus (MN) testi hücre kültürünün yapılması	76
3.2.13. MN preparatlarının hazırlanması ve boyanması	76
3.2.14. MN preparatlarının mikroskopik incelemesi.....	77
3.2.15. KKD ve MN testleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi	79
3.2.16. Mikrofotografi	80
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	81
4.1. SMART için İnsektisitlerin LD ₅₀ ve LD ₁₀₀ Değerlerinin Belirlenmesi	81
4.2. SMART Uygulamasından Elde Edilen Bulgular	83
4.2.1. Kontrol gruplarına ait SMART bulguları	83
4.2.2. Bifentrin insektisitine ait SMART bulguları	86

4.2.3. Permetrin insektisitine ait SMART bulguları.....	88
4.2.4. İmidakloprid insektisitine ait SMART bulguları	90
4.2.5. Asetamiprid insektisitine ait smart bulguları	92
4.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testinden Elde Edilen Bulgular	94
4.3.1. Kontrol gruplarına ait KKD bulguları	95
4.3.2. Bifentrin insektisitine ait kkd bulguları	96
4.3.3. Permetrin insektisitine ait KKD bulguları	98
4.3.4. İmidakloprid insektisitine ait KKD bulguları	100
4.3.5. Asetamiprid insektisitine ait KKD bulguları	102
4.4. Mikronükleus Testi (MN) ile Elde Edilen Bulgular	105
4.4.1. Kontrol gruplarına ait mn bulguları	105
4.4.2. Bifenthrin insektisitine ait MN bulguları	107
4.4.3. Permetrin insektisitine ait MN bulguları	109
4.4.4. İmidakloprid insektisitine ait mn bulguları	110
4.4.5. Asetamiprid insektisitine ait MN bulguları	112
4.5. İnsektisit ve Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.) Bitkisine ait Metanol Ekstraktının (PO _{met}) <i>İn vivo</i> ve <i>İn vitro</i> Testler için Birlikte Uygulaması	114
4.5.1. İnsektisitlere PO _{met} uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları	114
4.5.2. İnsektisit+PO _{met} uygulaması sonucu elde edilen KKD bulguları	117
4.5.3. İnsektisit+PO _{met} uygulaması sonucu elde edilen MN bulguları	118
4.6. İnsektisit ve Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.) Bitkisine ait Su Ekstraktının (PO _{su}) <i>İn vivo</i> ve <i>İn vitro</i> Testler için Birlikte Uygulaması	120
4.6.1. PO _{su} uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları	120
4.6.2. İnsektisit+PO _{su} uygulaması sonucu elde edilen KKD bulguları	123
4.6.3. İnsektisit+PO _{su} uygulaması sonucu elde edilen MN bulguları.....	124
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	126
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	156

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bd^S	Serratlık geni
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMS	Etil metansülfonat
EPA	Çevre koruma ajansı
EXTOXNET	Toksikoloji bilgi sistemi
FBS	Fetal Bovine Serum
flr^3	<i>Flare</i> geni
g	Gram
H ₀	Orijinal (null) hipotez
H _a	Alternatif hipotez
IPCS	Uluslar arası kimyasal korunma programı
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum hidrojen fosfat
KİF	Klon indüksiyon frekansı
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LD ₅₀	Bir popülasyondaki bireylerin yarısını öldüren uygulama dozu
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MN	Mikronükleus
<i>mwh</i>	<i>multiple wing hair</i> =Çoklu kanat kıllığı geni
Na	Sodyum
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat

NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
nm	Nanometre
O	Oksijen
PBS	Fosfat tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
TM3	Dengeleyici kromozom
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
α	Alfa
β	Beta
°C	Santigrat derece
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
%	Yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bifentrinin kimyasal formülü	6
Şekil 1.2. Permetrinin kimyasal formülü	7
Şekil 1.3. İmidaklopridin kimyasal formülü	9
Şekil 1.4. Asetamipridin kimyasal formülü	10
Şekil 1.5. KKD oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	16
Şekil 1.6. Herlaquin (Hq) kromozomlar	17
Şekil 1.7. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	18
Şekil 1.8. Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.) bitkisine ait görüntüler	21
Şekil 3.1. <i>D. melanogaster</i> 'in Oregon R soyu (yabani tip) erkek ve dişi bireyleri	42
Şekil 3.2. <i>D. melanogaster</i> 'in hayat döngüsü (Anonymous 2012)	45
Şekil 3.3. Multiple wing hair (<i>mwh</i>)	46
Şekil 3.4. Flare (<i>flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s</i>).....	46
Şekil 3.5. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri	48
Şekil 3.6. Semizotu (<i>Portulaca oleracea</i> L.) bitkisine ait çeşitli görüntüler	49
Şekil 3.7. Semizotu metanol ekstraktının hazırlanma düzeneği	50
Şekil 3.8. <i>D. melanogaster</i> 'de larval döneme ait imajinal diskler ve ergin bireyde oluşturdukları vücut kısımları.....	53
Şekil 3.9. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi	55
Şekil 3.10. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin uygulama şekli ve sonuçlarının şematik gösterimi	57
Şekil 3.11. Trans-heterozigot bireylerin kanatlarındaki farklı kıl tipleri	58
Şekil 3.12. <i>mwh</i> fenotipindeki küçük tek tip klon	59
Şekil 3.13. <i>mwh</i> fenotipindeki büyük tek tip klon	59
Şekil 3.14. <i>flr³</i> fenotipindeki büyük tek tip klon.....	60
Şekil 3.15. <i>mwh</i> ve <i>flr³</i> fenotiplerini beraber taşıyan ikiz klon	60
Şekil 3.16. Kardeş kromatid değişimleri	62
Şekil 3.17. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	63
Şekil 3.18. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler	67
Şekil 3.19. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler.....	72

Şekil 3.20. DNA'nın semikonservatif replikasyonu sonucu 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin BrdU ile ayırt edilmesinin şematik olarak gösterimi	73
Şekil 3.21. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	74
Şekil 3.22. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	75
Şekil 3.23. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	75
Şekil 3.24. MN testi mikroskopik inceleme sahası genel görünümü.....	78
Şekil 3.25. Bir, iki, üç ve dört nükleus içeren hücreler.....	79
Şekil 4.1. Etil metansülfonat'a ait ikinci mitoz geçirmiş metafaz plağı	95
Şekil 4.2. Bifentrin uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı	97
Şekil 4.3. Permetrin uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı	99
Şekil 4.4. İmidakloprid uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı.....	101
Şekil 4.5. Asetamiprid uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı.....	103
Şekil 4.6. Etil metansülfonat'a ait üçlü mikronükleus	106
Şekil 4.7. Bifentrin insektisitine ait üçlü mikronükleus	108
Şekil 4.8. Permetrin insektisitine ait üçlü mikronükleus	109
Şekil 4.9. İmidakloprid insektisitine ait üçlü mikronükleus	111
Şekil 4.10. Asetamiprid insektisitine ait üçlü mikronükleus	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Portulaca oleracea</i> (semizotu) bitkisinin sistematığı	20
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	40
Çizelge 3.2. <i>Drosophila</i> Lewis besin ortamının içeriği	40
Çizelge 3.3. Faure solüsyonunun içeriği	41
Çizelge 3.4. Kromozom medyumunun her 100ml’inde bulunan madde ve miktarları .	41
Çizelge 3.5. İnsektisitlerin LD ₁₀₀ değerine göre seçilen uygulama grupları	65
Çizelge 4.1. Trans-heterozigot larvalara uygulanan insektisitler için, belirlenen LD ₁₀₀ değerleri ve SMART uygulama gruplarının hayatta kalma/larval mortalite oranları	82
Çizelge 4.2. SMART’da kontrol gruplarına ait bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları.....	85
Çizelge 4.3. Bifentrin uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları	87
Çizelge 4.4. Permetrin uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları	89
Çizelge 4.5. İmidakloprid uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları	91
Çizelge 4.6. Asetamiprid uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları	93
Çizelge 4.7. Kontrol gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	96
Çizelge 4.8. Kontrol gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	96
Çizelge 4.9. Bifentrin uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	98
Çizelge 4.10. Bifentrin uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	98
Çizelge 4.11. Permetrin uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	100
Çizelge 4.12. Permetrin uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	100

Çizelge 4.13. İmidakloprid uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	102
Çizelge 4.14. İmidakloprid uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	102
Çizelge 4.15. Asetamiprid uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	104
Çizelge 4.16. Asetamiprid uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları	104
Çizelge 4.17. Kontrol gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları	107
Çizelge 4.18. Bifentrin uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları	108
Çizelge 4.19. Permetrin uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları	110
Çizelge 4.20. İmidakloprid uygulama gruplarına ait toplam MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları	111
Çizelge 4.21. Asetamiprid uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları.....	113
Çizelge 4.22. İnsektisit+PO _{met} uygulamasından elde edilen SMART bulguları ve istatistiksel analizleri	116
Çizelge 4.23. İnsektisit+PO _{met} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri	118
Çizelge 4.24. İnsektisit+PO _{met} uygulama gruplarına ait Rİ değerleri	118
Çizelge 4.25. İnsektisit+PO _{met} uygulama grupları için MN değerleri	119
Çizelge 4.26. İnsektisit+PO _{su} uygulamasında elde edilen SMART bulguları	122
Çizelge 4.27. İnsektisit+PO _{su} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri	123
Çizelge 4.28. İnsektisit+PO _{su} uygulama gruplarına ait Rİ değerleri	124
Çizelge 4.29. İnsektisit+PO _{su} uygulama grupları için MN değerleri ve istatistiki analizleri	125

1. GİRİŞ

Günümüzün en önemli sorunlarından biri nüfusun hızla artmasıdır. 1927’de 2 milyar olan dünya nüfusu, günümüzde 7 milyarı geçerken, 1927 yılında yaklaşık 13 milyon olan ülke nüfusumuz ise 2014 yılı sonunda 77 milyondan fazla olmuştur (Türkiye İstatistik Kurumu resmi sitesi) (TÜİK 2015). Hızlı nüfus artışıyla beraber gıda ihtiyacı da aynı oranda artmaktadır. Ancak tarımsal alanların ve hayvansal üretimin kısıtlı olması, artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamada yetersiz kalmıştır. Örneğin dünyada tarıma ayrılan alan, 1950’den günümüze kadar 1,4 milyar hektar olarak sabit kalmıştır. Nüfusun bu hızlı artışına karşın ekim alanlarının sabit kalması, beslenme için gerekli olan tarımsal gıda üretimini ancak modern tarım tekniklerinin kullanılmasıyla mümkün kılmaktadır (Durmuşoğlu vd 2010). Bu nedenle tarımda birim alandan elde edilebilecek verimi artırmak için yeni tarım tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına gereksinim duyulmuştur (Demircan ve Yılmaz 2005). Geleneksel tarımdan modern tarıma geçiş, ürün verimliliğini arttırmış, ancak bu tekniklerin ve sulu tarımın yaygınlaşması ise bitki hastalıkları ve zararlılarının salgın haline gelmesine yol açmıştır (Arslan ve Yılmaz 1993).

Tarihsel süreç bize insanların tarımsal ürünlerini hastalık ve zararlılardan koruyamadığını, dolayısıyla sağlıklı gıda elde etmekte yetersizliklerle karşılaştığı zamanların olduğunu göstermiştir. İrlanda’da 1846 ile 1851 yılları arasında yaşanan ve 1,5 milyon insanın ölümüyle sonuçlanan, patates mildiyösü hastalığı sonucu oluşan büyük kıtlık, buna en iyi örneklerden biridir. Günümüzde ise Dünya hububat üretiminin yaklaşık %20 si hasat öncesi ve sonrası aşamalarda kaybolmaktadır. Bu kayıp insanları tarımsal ürünlerini korumak, sağlıklı gıda elde etmek için tarımda yeni savaş yöntemleri arayışına itmiştir. İnsanlık eski çağlardan beri tarım ürünlerine bulaşan ve verimi düşüren zararlılarla mücadele için yeni yöntemler geliştirmiştir.

Tarımsal mücadele, ürünlerin hastalık, zararlı ve yabancı otlardan korunması, hasat miktarının ve kalitenin artırılmasıdır. Bu basit tanımdan da anlaşılacağı gibi, tarımsal

mücadele ile bir yandan ürünü ve kalitesini arttırmak, bir yandan da tarımsal mücadelenin ekonomik olması hedeflenmektedir. Bu amaca ulaşabilmek için mücadelenin entegre savaş ya da entegre zararlı yönetimi görüşüne uygun olarak yürütülmesi gerekmektedir. Entegre zararlı yönetimi denildiğinde ise, insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olanların uygulanmasına yönelik çalışmalar anlaşılmaktadır (Delen vd 2005). Tarım teknolojisi gelişmeden önce bu yöntemler kurutma, tütsüleme ve çeşitli koruyucu maddeler içeren bitkilerle muamele ederek saklama olarak sayılabılırdi. Şöyle ki; milattan önceki yıllardan beri kutsal sayılan tuzlar ve bitkiler, böceklere karşı kullanılmış, Roma ve eski Yunan uygarlıklarından beri süregelen ve milattan sonra 1700'lere kadar da zirai koruyucu (pestisit) olarak kullanılmışlardır (Ware 1980).

Meister (1999)'e göre pestisit, insan ve hayvan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, depolanma ve tüketimi sırasında besin değerini düşüren ya da zarara uğratan böcek, kemirici, yabancı ot, mantar gibi canlı formlarının yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Pestisitler biyolojik aktivitesi için seçilen ve biyosidal özellikleri için kullanılan bileşiklerdir (Eastmond and Balakrishnan 2001).

Tarihte kullanılan ilk pestisitler kükürt, arsenik, bakır ve demirin basit tuzları gibi inorganik maddelerdir. Organik bileşik olarak ilk kez kullanılan pestisitler *Derris* sp. (tropikal sarmaşıklar) ve *Terphrosia* sp. bitkilerinin köklerinden elde edilen rotenon, *Nicotiana* sp. (tütün)'den elde edilen nikotin ve *Pyrethrum* sp. (krizantem)'den elde edilen piretrumdur. Bu pestisitlerden birçoğu yüksek düzeyde toksiktir ve kullanımları tehlikelidir (Yıldız vd 2005).

Pestisitler tarımda zararlı hayvanlara, yabancı otlara ve hastalıklara karşı geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Aynı zamanda birçok iç ve dış parazite karşı, hayvansal üretim sürecinde ve halk sağlığını korumak için karasinek, sivrisinek ve ev böceklerine karşı da kullanılmaktadırlar. Pestisitler farklı alt grupları ile farklı türlere özgüdürler

(Greene and Pohanish 2005; Yıldız vd 2005). Pestisitlerin alt grupları ve hedefledikleri canlı grupları aşağıdaki gibidir;

Akarisitler; akarlar ve örümcekleri öldürücülerdir. Bunlara mitisit de denir.

Algisitler; göller, kanallar, yüzme ya da süs havuzlarındaki algleri öldürmek için kullanılan endüstriyel koruyuculardır.

Avisitler; kuş öldürücülerdir, kullanımları kısıtlıdır.

Biopestisitler; doğal materyallerden, örneğin krizantem (pireotu) ekstresinden elde edilen piretrum gibi pestisitlerdir.

Biositler; mikroorganizma öldürücülerdir.

Büyüme düzenleyiciler; zararlı bitki ve böceklerin yaşam süreçlerini bozucudurlar.

Dezenfektanlar; cansız yüzeylerde bulunan mikroorganizmaları öldürücülerdir.

Fungisitler; küf ve mantarları öldürücülerdir.

Sinerjistler (etki artırıcı); öldürme gücünü arttıran, toksik olmayan aktif maddelerdir.

Herbisitler; yabancı ot ve istenmeyen bitkileri öldürücülerdir.

İnsektisitler; böcek öldürücülerdir.

Molluskisidler; salyangoz ve sümüklü böcekleri öldürücülerdir.

Nematisitler; bitki köklerinde beslenen nematodları öldürücülerdir.

Ovisitler; akar ve böcek yumurtalarını öldürücülerdir.

Piskisitler; balıkları öldürücülerdir.

Predasitler; omurgalı yırtıcıları öldürücülerdir.

Repellentlar; böcek ve kuşları uzaklaştırıcılarıdır.

Rodentisitler; fare, sıçan ve diğer kemirgenleri öldürücülerdir.

Sanitizerler (dezenfektan canlı yüzey); derideki mikroorganizmaları öldürücülerdir. Genellikle tıbbi ortam ve evlerdeki sabunların ve temizleyicilerin içinde kullanılırlar.

Tütsüler; gaz veya duman kullanarak binalarda veya toprakta bulunan böcek, mantar ve diğer bilinmeyen organizmaları öldüren dezenfektanlardır.

Yaprak dökücüler; parazit bitkilere ait yaprak ve diğer yeşil bölgeleri öldürücülerdir.

Çürümeyi önleyiciler; tekne tabanları ve diğer su altı yüzeyleri gibi yerlerdeki organizmaları öldürmek veya organizmaların yüzeye bağlanmasını engellemek için kullanılan kimyasallardır (Zeliger 2008).

Türkiye genelinde kullanılan pestisitlerin %47'si insektisit, %24'ü herbisit, %16'sı fungusit ve %13'ü diğer pestisit alt gruplarındandır (Delen 2008).

1.1. İnektisitler

Birçok alanda kullanılan ve zararlı canlıların kontrolünü sağlayan pestisitlerin bir alt grubu olan inektisitler, tarımsal üretimde, ürünlerin depolanmasında, evlerde ve endüstriyel ürünlerde zararlı böceklerin öldürülmesi ya da çoğalmalarının durdurulması amacıyla kullanılan kimyasal bileşiklerdir. Besin kaybını %100'e kadar çıkarabilen zararlı böceklerin kontrol altına alınmasında inektisitlerin yardımı büyüktür. Fakat hemen hemen bütün inektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer canlıları da etkilerler (Sayılı ve Akman 1994). İnektisitlerin bilinçsiz kullanılmaları, faydalı organizmaların yok olmasına ve genetik çeşitliliğin de tehlike altına girmesine neden olarak gösterilmiştir (Güngör 2003).

İnektisitler, etkilerini çoğunlukla sinir sistemi fonksiyonlarını bozarak gösterirler (Gubler 1998). Dolayısıyla sinir sisteminde iletimi engelleyecek kimyasal bileşiklerden oluşmaktadırlar. Omurgalı ve omurgasız hayvanların çoğunda sinir iletimi benzerdir. Dolayısıyla inektisitlerin yaygın kullanımı insan ve çevre için büyük risk taşımaktadır. (Cantelli-Forti *et al.* 1993).

İnektisitlerin etki mekanizmaları benzer olmasına rağmen sentetik üretimleri aşamasında içerdikleri organik bileşik yapılarına göre, organoklorlular, organofosfatlılar, karbamatlar, piretroidler ve neonikotinoidler olarak sınıflandırılmışlardır.

Bu çalışmada genotoksitesini belirlemek için kullandığımız inektisitler piretroid ve neonikotinoid grubundandır.

1.1.1. Piretroidler

Piretroidler krizantem çiçekleri tarafından üretilen doğal piretrinlere benzeyen organik kimyasallardır. Ancak doğal piretroidler ışığa dayanıksız ve doğada çok çabuk

bozunmaları nedeni ile (Vural 2005) çoğunlukla ev böceklerine karşı kullanılır (Robert 2002). 1973 yılında ışığa dayanıklı sentetik piretroitlerin sentezlenmesi ile 1975 yılından sonra açık alanlarda böceklere karşı hızla kullanılmaya başlanmıştır (Atamanalp ve Cengiz 2002). Son yıllarda dünyada kullanılan insektisitlerin %30'unu sentetik piretroidler oluşturmaktadır. Hedef organizma olan böceklere karşı çok toksik, kuşlar ve memelilere karşı az toksik olmaları nedeniyle kullanım alanlarında sıklıkla tercih edilmektedirler (Mazmancı vd 2008). Sentetik piretroidler, doğal piretrinlerin alkol ve asit köklerinde yapılan değişikliklerle geliştirilmişlerdir. Ancak sentetik piretroitler kolay kolay parçalanmadıklarından dolayı kalıntıları ciddi problemlere sebep olur. Çoğunlukla ev zararlılarının kontrolü için aerosol ve sinekkovar şeklinde kullanılmaları, ayrıca diğer insektisitler ve sinerjistler ile kombine olarak hazırlanmaları nedeniyle insanların bu insektisitlere maruz kalması kaçınılmazdır ve tehlikeli sonuçlarının olabileceği bildirilmektedir (International Programme on Chemical Safety/ Uluslararası kimyasal korunma programı) (IPCS 1990; Mercan 2007).

Piretroidler böceklerin merkezi ve çevresel sinir sistemlerini etkileyerek felce neden olurlar (Miller and Salgado 1985). Böcek ve memelilerde toksik ve genotoksik etki mekanizmaları benzerdir. Şöyle ki; toksik etkilerini memeliler ve böceklerdeki sodyum kanalları üzerinde gösteren, periferik ve merkezi sinir sistemlerindeki aksonları etkileyen sinir sistemi zehirleridir (IPCS 1990).

Ülkemizde tarımsal koruma amaçlı, piretroid insektisit içeren 194 ticari ürün kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan piretroid insektisit grubundan olan Bifentrin ve Permetrin ülkemizdeki ticari ürünlerin 10'unda bulunmaktadır (Aydınoğlu vd 2002).

1.1.1.a. Bifentrin

Bifentrin (BİF), tarımsal üretimde sıklıkla kullanılan üçüncü nesil piretroid insektisitlerdendir. Bu grup, önceki piretroidlerden farklı olarak daha fazla ışığa dayanıklı ve daha yüksek toksik aktivite göstermektedir (Mokrey and Hoagland 1989). Hafif tatlı kokulu, mumsu beyaz ile kahverengi arasında renklerde, katı toz, granül ve

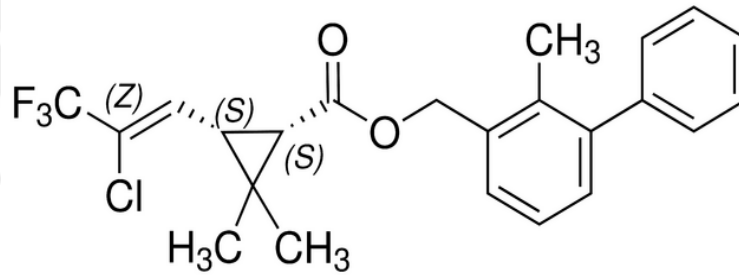
peletler gibi çeşitli biçimlerde sentezlenir. Sentetik kimyasal maddedir, doğal olarak bulunmaz. Bu insektisit kimyasal formülü Şekil 1.1’de verilmiştir. Toprak tiplerine göre yarılanma ömrü 7 gün ila 8 ay civarında olan BİF, suda çözünmez veya çok az çözünerek geride kalıntılar bırakır. Çeşitli kaynaklara göre, piyasada bilinen sentetik insektisitler içerisinde toprakta en fazla kalıntı bırakan insektisittir (Environmental Protection Agency/ Çevre koruma ajansı; Extension Toxicology Network/ Toksikoloji bilgi sistemi) (EPA 2010; EXTOTNET 1996).

Molar kütle: 422,87 g / mol

Suda çözünürlüğü: % 0,04

Erime noktası: 66-67,7°C

Moleküler formülü: $\text{Cl}_{23}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{O}_2$



Şekil 1.1. Bifentrinin kimyasal formülü

Sentetik piretroid ailesinin üyesi olan BİF, diğer piretroidler gibi böceklerin merkezi ve çevresel sinir sistemlerinde, sodyum kanallarını etkileyerek felce neden olmaktadır (Miller and Salgado 1985). Ülkemizde ve dünyada özellikle afit, ateş karıncaları, bitler pireler, örümcek, kene ve sineklere karşı, süs bitkileri, şerbetçi otu, ahududu, mısır ve pamuk zararlıları ile ev, iş yerleri ve okullarda kullanılmaktadırlar (EPA 2010).

1.1.1.b. Permetrin

1. nesil sentetik piretroidlerden olan Permetrin (PER), gıda üretiminde, hayvancılıkta ve halk sağlığında kullanılan geniş spektrumlu yüksek etkili bir insektisittir. Kimyasal formülü Şekil 1.2’de gösterilmiştir. Özellikle insanlarda ve hayvanlarda bit, pire, kene

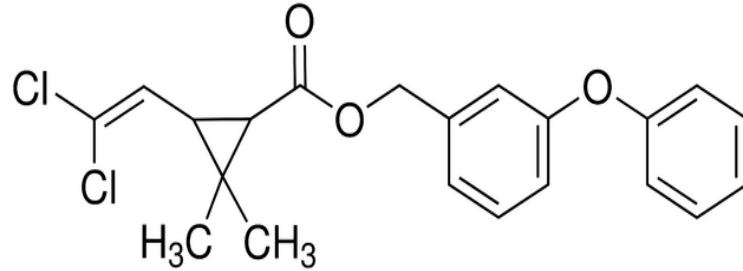
vb. parazit kovucu olarak şampuan veya solüsyonların içerisinde, depoların ve binaların ilaçlanmasında kullanılan temas yoluyla etkili bir insektisittir. Tarımda ise meyve bahçelerinde, bostanlarda, pamuk ve patates üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Kokusuz, renksiz kristal ya da açık kahverengi sıvı halde sentezlenir. Toprakta yarılanma ömrü 30-38 gündür (Wauchope *et al.* 1992). Neredeyse hiç kalıntı bırakmaz. Ancak toprakta süzülmeden inorganik parçalara bağlanarak kalıntılar meydana getirmektedir. Işığa karşı çok duyarlı olup güneş ışığında yarılanma ömrü 4-6 güne düşer (Anonymous 1990; EXTOWNET 1996).

Molar kütle: 391,29 g / mol

Su çözünürlüğü: % 0,01

Erime noktası: 34-35°C

Moleküler formülü: C₂₁H₂₀Cl₂O₃



Şekil 1.2. Permetrinin kimyasal formülü

PER'de, diğer piretroid insektisitler gibi böceklerde sinir sistemi üzerine etkilidir. Sodyum kanallarının etkileyerek nöron fonksiyonlarını bozar ve kaslarda spazma neden olur. Aşırı birikimi sonucunda felç ve ölüm gözlenir (Tomlin 2006).

1.1.2. Neonikotinoidler

Neonikotinoidler, tütün bitkisinin bir ürünü olan nikotinin kimyasal yapısı baz alınarak üretilen sentetik insektisitlerdir. 1970'li yıllardan itibaren çeşitli amaçlarla sıklıkla kullanılan ve içerikleri bakımından 3 farklı insektisit türü olan organofosfat, karbamat

ve piretroid insektisitlere karşı zararlılarda direnç gelişmiştir. Bunun sonucunda zararlıların kontrol edilmesinde verim azalmıştır. Bu gibi nedenlerle son on yıldır neonikotinoidler farklı etki mekanizmaları nedeniyle, direnç geliştiren birçok önemli zararlının kontrol edilmesinde etkili olmuştur ve neonikotinoidler için 2008'de dünya insektisit piyasasında %24 oranında pazar payı oluşmuştur (Jeschke *et al.* 2011).

Neonikotinoidler, tıpkı nikotin gibi hücrelerdeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörler böceklerde sadece çevresel sinir sisteminde bulunurken memelilerde hem çevresel hemde merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır. Nikotinik asetilkolin reseptörleri nörotransmitter asetilkolin ile aktive edilir. Daha sonra bu asetilkolinlerin yıkılması için asetilkolinesteraz enzimi salgılanarak reseptörlerdeki asetil ve kolinler bileşiklerine ayrılır. Ancak neonikotinoid insektisitler bu reseptörlere dönüşümsüz bağlandıkları için, yıkıma uğrayamazlar. İnsektisitler reseptörlere bağlı olduğu için sürekli asetilkolinesteraz üretimi devam eder. Bu da asetilkolinesteraz birikimine neden olarak paralize ve sonuçta böceğin ölümüne neden olur. (Gervais *et al.* 2010)

Bu çalışmada kullanılan neonikotinoid ailesinin ilk üyesi olan imidakloprid ve asetamiprid, dünyada ve ülkemizde en çok kullanılan insektisitler arasında yer almaktadır.

1.1.2.a. İmidakloprid

Kimyasal formülü 1-(6-cloro-3-pyridylmethyl) -2-nitroimino-imidazolidin olan İmidakloprid (İMİ), neonikotinoid insektisitlerin ilk üretilen bileşiğidir (Kong *et al.* 2008). Kimyasal formülü Şekil 1.3'de verilmiştir. Bütün neonikotinoidler gibi İMİ'de sinir sistemi üzerine etkilidir ve dünyada hızla artan bir pazar payına sahiptir (Liu *et al.* 2010). İMİ'nin, ışığa dayanıklı olması (Mullins 1993) ve omurgalılara kıyasla böceklerde yüksek seçici toksisite göstermesi, dünya çapında yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Tomizawa and Yamamoto 1993). İMİ, ABD Çevre Koruma

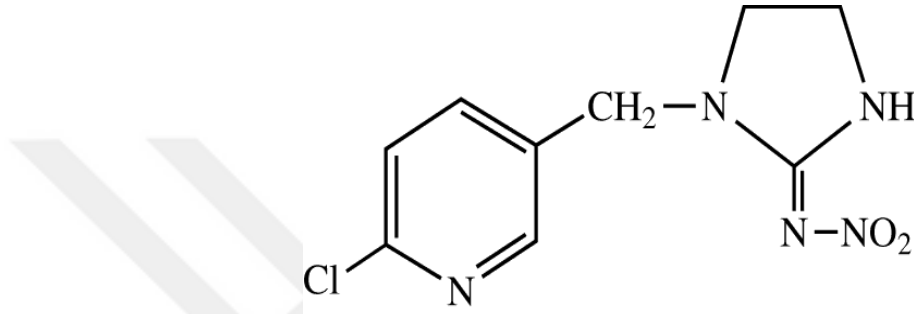
Ajansı (EPA) tarafından “uyarı” ve “dikkatli olun” manasına gelen 2. ve 3. sınıf toksik etkili olarak sınıflandırılmaktadır (Meister 1995).

Molar kütle: 255,66 g / mol

Suda çözünürlüğü: % 0,15

Erime noktası: 144-144,5°C

Moleküler formülü: C₉H₁₀ClN₅O₂



Şekil 1.3. İmidaklopridin kimyasal formülü

Bu insektisit özellikle sebzelerde, meyvelerde, şeker pancarında, pamukta ve pirinçte Homoptera (eş kanatlılar) ve Hemiptera (yarım kanatlılar) takımlarına ait zararlıların mücadelesinde kullanılmaktadır (Matsuda *et al.* 2001). Sistemik insektisitlerden olan imidakloprid, topraktan bitkiye alınarak, yaprak, meyve, polen ve nektara ksilem boyunca taşınabilir. (Fossen 2006). Ayrıca kedi ve köpeklerin üzerinde yaşayan Siphonapterlere (parazit kan emici kanatsız böcekler) karşı (Tomizawa and Casida 2005) kullanılmaktadır. Ülkemizde ise pamuk bitkisinde pamuk yaprakbiti dışında meyve, sebze, tütün, antepfıstığı, turunçgiller ve bağda bulunan çeşitli zararlılara karşı ruhsatlı olarak yaygın biçimde kullanıldığı bilinmektedir (Yücer 2012). Yarılanma ömrü normal şartlarda 33-44 gündür.

1.1.2.b. Asetamiprid

1990'ların başlarında kullanılmaya başlanılan Asetamiprid (ASE), neonikotinoid insektisitler grubuna dâhil olup, bir siyanoamidin ve bir 6-kloro-3-piridilmetil

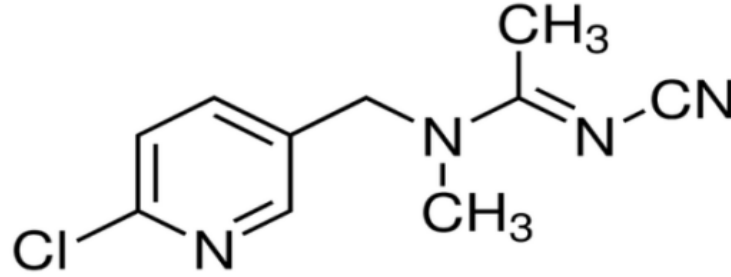
kısımından ibarettir (Brunet *et al.* 2005) ve neonikotinoid insektisitlerden üretimine başlanan ikinci bileşiktir. Kokusuz, beyaz toz halinde sentezlenir (Şekil 1.4). Toprakta aerobik ortamda hızlı şekilde parçalanır. Yarılanma ömrü 1-8 gündür. Türkiye’de ASE etken maddesine sahip ilk ruhsatlı insektisit 1996 yılında Mospilan ticari ismi ile piyasaya sürülmüştür (Dursun vd 2013). İmidakloprid gibi sistemik insektisit olduğu için daha çok emici böcekler üzerine etkindir. Dünyada ve ülkemizde, pamuk, tütün, şeftali, patates ve domateste, patates böceği, beyaz sinek, yaprak biti ve yaprak piresine karşı kullanılır.

Molar kütle: 222,67 g / mol

Suda çözünürlüğü: % 0,02

Erime noktası: 97,8-98,8°C

Moleküler formülü: Cl₁₀H₁₁ClN₄



Şekil 1.4. Asetamipridin kimyasal formülü

ASE böceklerin merkezi sinir sisteminde asetilkolin (ACh) gibi davranarak, nikotinik ACh reseptörlerine bağlanır. Uyarı sonucu doğal olarak oluşan ACh, alıcı reseptörleri tıkalı olduğu için sinaptik bölgede yığılmakta ve sonuçta böceğin ölümüne sebep olmaktadır (Öncüer ve Durmuşoğlu 2008).

ASE siyanoamidin türevi bir insektisit olduğu için düşük konsantrasyonlarda daha fazla genotoksik etki göstermektedir.

1.2. Genetik Toksikoloji

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır (Choy 2001; Young 2002; Vural 2005). Bir organizmanın genetik işaretlerinde, kalıtsal bir farklılaşma oluşturan maddelere genel olarak genotoksik ajan (genetik zehir) denir. Genotoksik ajan, gonadların gamet hücrelerini etkileyerek, ya gametlerin sayıca azalmasına ya da gametlerdeki genetik bilginin değişmesine neden olur. Bu şekilde meydana gelen iki ayrı cinsiyete ait gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot ölmezse anne ve babadan farklı olur. Bunun sonucunda, genotipdeki kalıcı değişmeye "mutasyon", mutasyona neden olan etkenlere de "mutajen" denilmektedir. Bununla beraber mutasyonlar somatik doku hücrelerinde de olabilir, bu takdirde sonraki nesillere geçmez. Bu değişim daha çok karsinogeneze zemin olması açısından önem taşır (Vural 2005).

“Genetik toksisite” ya da “genotoksisite”; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom yapısı anormallikleri ve anöploidi gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA’da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise “genotoksik etki” olarak tanımlanmaktadır (Choy 2001; Young 2002; Zeiger 2004).

Genetik toksikoloji testlerinde herhangi bir organizmadan elde edilen sonuçlar DNA molekülündeki hasarları gösterdiği için, insan genomunda ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılabilir. Bir organizmada DNA hasarı oluşturma potansiyeli olan kimyasal maddeler, farklı organizmalarda ve insanda da benzer etkiler gösterebilir. Son yıllarda organizmalardaki genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile çeşitli canlılar üzerinde veya hücrelerinde uygulanabilecek yüzlerce kısa süreli *in vivo* ve *in vitro* test metodu geliştirilmiştir.

1.2.1. Genetik toksikolojide kullanılan bazı test teknikleri

1920'den beri kullanılan ve geliştirilen genotoksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır (Vural 2005).

In vivo mutajenite testlerde, mutajenik etkisi belirlenecek genotoksik ajan belli konsantrasyonlarda ve çeşitli yollarla (beslenme, enjeksiyon vb.) organizmaya verilmekte ve insanların çeşitli sebeplerle karşılaşabilecekleri genotoksik ajanlara maruziyet sonrasında oluşabilecek genotipik hasarlar araştırılmaktadır. Örneğin; *in vivo* kanat somatik mutasyon testinde *Drosophila melanogaster*'in larvalarının besi ortamına eklenecek herhangi bir genotoksik ajan, metamorfoz tamamlandığı zaman ergin bireyin kanatlarında somatik mutasyon olarak kendini göstermektedir. *Drosophila* ile yapılan testler, yavru birey sayısının fazla olması, genetik yapısının insan genomuyla benzerlik göstermesi, laboratuvar şartlarının ve bakımının kolay olması açısından, kısa süreli, ucuz ve sonuçları güvenli testlerdir.

In vitro mutajenite testlerinde ise genotoksik etkisi araştırılacak olan madde, deney hayvanından veya insandan alınan dokulara belli konsantrasyonlarda uygulanır. Bu testlerin *in vivo* testlerden farkı, test edilen kimyasal madde doğrudan canlıya değil, ondan alınan dokuya laboratuvar ortamında dokunun canlı tutularak uygulanmasıdır. İnsan kanında birçok farklı hücre tipi bulunmasına rağmen kromozom veya DNA ile ilgili çalışmalar genellikle çekirdekli lenfosit hücreleri ile yapılmaktadır. Periferik kan kültürü yöntemi olarak bilinen bu yöntem, kısa sürede istenilen sayıda hücrenin incelenebilmesi, kültür süresinin kısa olması ve elde edilen kromozom preparatlarının diğer yöntemlerle elde edilenlerden daha kaliteli olması nedeniyle tercih edilmektedir (Rooney and Czepulkowski 1986; Öztaş 2000; Başaran 2003).

Her test sisteminin, farklı mekanizmaları hedef alarak çalışılması sebebiyle bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test

sisteminin kullanılması gerekmektedir (Houk 1992). Bu amaçla çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiştir. Günümüzde en çok kullanılan test sistemlerini, *Allium* testi (Levan 1938), *Salmonella* testi (Ames *et al.* 1975), mikronükleus testi (MN) (Mac Gregor *et al.* 1987), kardeş kromatid değişimi testi (KKD) (Latt *et al.* 1981), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) (Fairbairn *et al.* 1995) ve *Drosophila* testlerini, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf *et al.* 1984), eşeye bağlı resesif letal mutasyon testi (Tripathy *et al.* 1994), bitişik X (= yapışık X'lilik) ve nondisjunction(=ayrılmama) (Munoz and Barnett 2002) testleri olarak sıralayabiliriz.

Bu çalışmada BİF, PER, İMİ ve ASE insektisitlerinin genotoksik aktivitelerini belirlemek için hem *in vivo* hemde *in vitro* test teknikleri olarak bilinen SMART, KKD ve MN testleri kullanılmıştır.

1.2.1.a. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

Drosophila testleri ile çeşitli maddelerin genotoksik etkilerini tespit etmek mümkündür (Tiburi *et al.* 2002). Son yıllarda sıklıkla kullanılan SMART, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanması için oldukça uygun ve etkili bir *in vivo* test sistemidir (Graf *et al.* 1984). Genotoksik denemelerde işaret genlerinin fenotipte gözlenmesi, çalışmanın kolay ve ucuz olması, genotoksik ajanlardan etkilenme sonucu oluşan verilerin ölçümlerini yapmak *Drosophila* somatik hücrelerinde diğer organizmalara göre de kolaydır.

SMART, nokta mutasyonu, delesyon, translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi, belirli kromozom aberasyonlarının genetik sonuçlarının geniş yelpazesinin saptanmasına izin verir (Graf *et al.* 1984; Graf *et al.* 1996; Graf *et al.* 1998). *Drosophila* ile yapılan bu *in vivo* test yöntemi, mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite test sistemleri arasında bağlantı oluşturabilmektedir (Frei and Würzler 1996).

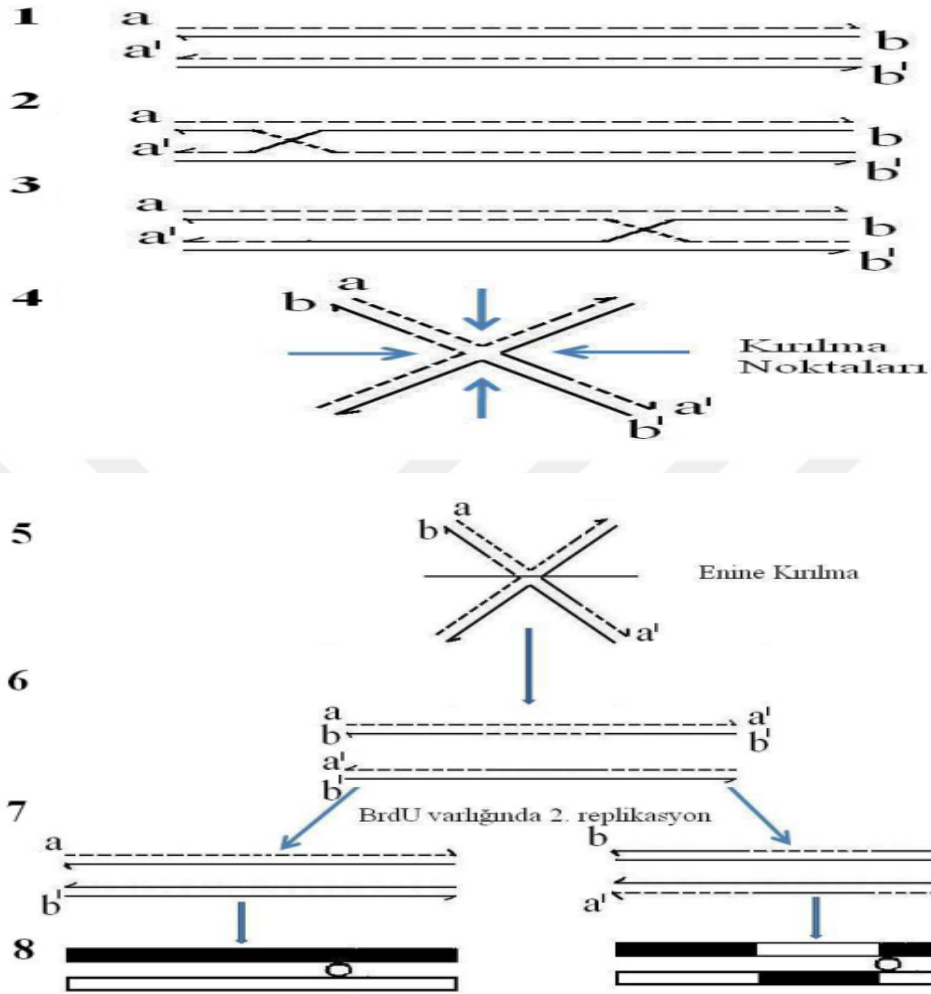
SMART, göz ve kanat benek testi olmak üzere iki çeşittir. Her ikisi de erken embriyonik gelişim sırasında hücre gruplarının (imajinal disk) genotoksik ajanlarla etkilenmesi esasına dayanmaktadır. İmajinal diskler, larval gelişimleri esnasında yetişkin sineğin vücut yapısına farklılaşmaya kadar mitotik olarak çoğalırlar (Graf *et al.* 1996; Graf *et al.* 1998), dolayısıyla somatik dokuda çok sayıda mutasyon gösterebilirler. Bu nedenle somatik sistem çok sayıda avantaj sunmaktadır. Bu avantajlardan bazıları şunlardır; testi yapabilmek için sadece bir generasyon gereklidir. Kanat ve göz gibi iki iyi bilinen somatik doku tek bir sinekte çok sayıda hücrenin (bir kanatta yaklaşık 25 000 hücre, bir gözde de yaklaşık 800 ommatidium) analizine izin verir. Bu hücrelerin sayımı kolay ve hücre belirleyicileri güvenilirdir (Graf and Würzler 1996).

Kanat benek testinde *mwh* ve *flr³* mutant ırkları çaprazlanarak F₁ trans-heterozigot bireylerin kanatlarında farklı mutant hücre klonları belirlenmektedir. *mwh* veya *flr³* fenotipi taşıyanlar tek tip klon olarak adlandırılırken, *mwh* ve *flr³* fenotipini beraber taşıyan klonlar ikiz klon olarak adlandırılır. Tek tip ve ikiz klon oluşumları farklı genetik mekanizmalara bağlıdır. Delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve iki işaret geni olan *mwh* ve *flr³* arasındaki mitotik rekombinasyon tek tip klonların oluşumunu tetiklerken; mitotik rekombinasyon hem tek tip klon hemde ikiz klonların oluşumuna sebep olmaktadır. İkiz klonlar ise 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Kaya *et al.* 2000). Serrat Kanada (*mwh/TM3*) sahip bireylerde *TM3* kromozomunun baskılanmasından dolayı mitotik crossing over gerçekleşmemektedir (Frei and Würzler 1996).

1.2.1.b. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

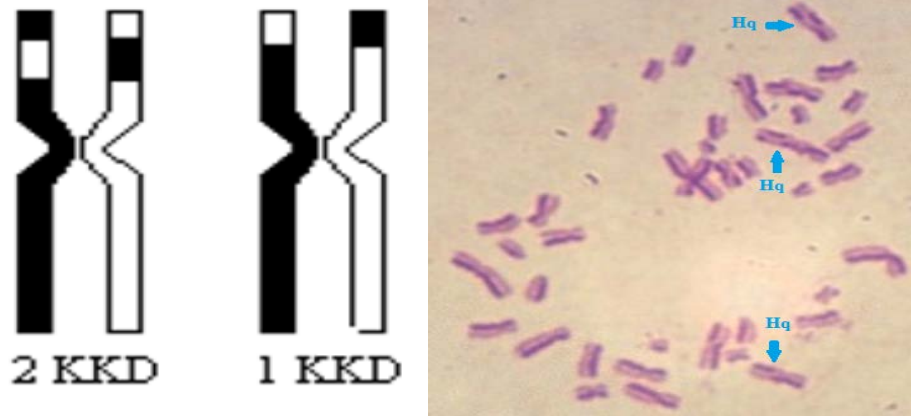
Kardeş kromatid değişimi (KKD), bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır (Latt *et al.* 1981). Bu kromozomal değişiklik Pery and Thomson (1984)'a göre, ilk kez 1957 yılında Taylor tarafından tanımlanmıştır.

Bu test yönteminde bir kromozomdaki iki kardeş kromatidi mikroskop altında birbirinden ayırtedebilmek için iki replikasyon döngüsünde bulunacak şekilde kültür ortamına BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin) eklenir. DNA sentezi sırasında timin yerine BrdU girer. Yeni oluşan DNA'nın her bir kromatidi, bir timinli ve bir de BrdU'lu DNA zinciri içerir (Şekil 1.1). BrdU'nun hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, floresan ışık altında ışınlanıp, kromozomlar giemsa ile boyanarak kardeş kromatidler farklı renkte görünür hale gelir (Natarajan 2002). Boyama sonrasında yapılan incelemede, bir kromatid iki tane BrdU içeren DNA zinciri taşıdığı için açık renk, diğeri ise bir timinli bir de BrdU'lu DNA zinciri taşıdığı için koyu renkli gözlenir (Perry and Wolff 1974). Uygulanan genotoksik ajan kardeş kromatitlerde parça değişimine neden olmuş ise, farklı boyanmış parçalar içeren kromatitlere sahip kromozomlar oluşur. Bu kromozomlara "herlaquin kromozom" adı verilir (Şekil 1.2). Mikroskop altında herlaquin kromozomlara rastlanması KKD olduğu göstermektedir (Perry and Wolff 1974).



Şekil 1.5. KKD oluşum mekanizmasının şematik gösterimi

- 1-Timin içeren kalıp DNA ve timin yerine BrdU alınarak sentezlenen koplementer DNA,
- 2-Her bir dublekste tek zincir kırığı oluşması ve zincirlerin krosing-over sonucu kardeş DNA dubleksinin zinciri ile birleşmesi,
- 3-Sentezin ilerlemesi ile timin ve BrdU içeren heterodubleks zincirlerin oluşması,
- 4-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile X formunun meydana gelmesi,
- 5- Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda enine kırılmanın meydana gelmesi,
- 6- Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,
- 7- Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun gerçekleşmesi ve sadece BrdU içeren koplementer zincirlerin sentezlenmesi,
- 8- Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi (Loveday and Latt 1978)



Şekil 1.6. Herlaquin (Hq) kromozomlar

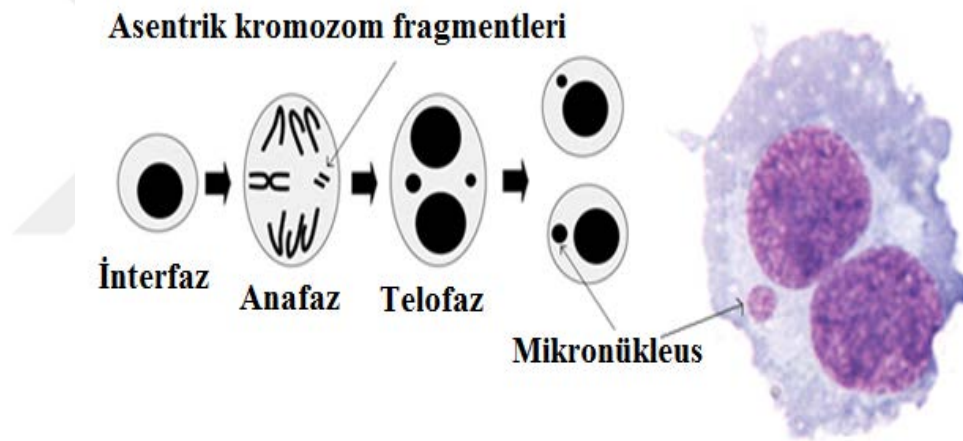
KKD oluşumu üzerinde etkili olabilen pek çok faktör mevcuttur. Bunlar, kültürlere eklenen BrdU miktarı (Rodriquez-Reyes and Morales 2003) ve antikoagülant türü (Tucker *et al.* 1993), inkübasyon sıcaklığı (Carrona and Natarajan 1988), ortamın PH'sı (Tanrıverdi 1991) gibi kültür faktörleri ve viral enfeksiyonlar (Kurvink *et al.* 1978), donörlerin sigara-alkol kullanımı (Lazutka *et al.* 1992; Tang *et al.* 1999), yaş (Ganguly 1995), cinsiyet (Anderson *et al.* 1986) ve kalıtsal hastalıklar (Aledo *et al.* 1989; Sönmez 1992), ilaç kullanımı, beslenme şekli, fiziksel (UV ve X ışınları) veya kimyasal ajanlara (pestisitler, insektisitler ve petrol ürünleri) maruziyet gibi faktörlerin de KKD frekansını etkileyebildiği belirtilmiştir (Kelsey *et al.* 1990; Baysal *et al.* 2003).

1.2.1.c. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus tekniği; kimyasal ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik (DNA'da yapısal hasar meydana gelmesi) ve anöjenik (DNA'da sayısal hasar meydana gelmesi) aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir test tekniğidir (Kirsch-Volders *et al.* 1997; Cicchetti *et al.* 1999). Fenech (2000)'e göre mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında anafazda geç kalan kromozom materyalinden veya iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen kromozomlardan veya parçalarından meydana gelmektedir. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar veya kromozom fragmentlerinin etrafında çekirdek zarı oluşarak ana nükleustan daha küçük yapıda nükleuslar oluşmaktadır (Şekil 1.3). Mikroskop altında bu yapılar incelenerek genotoksisite ve

sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi, hücre bölünmesinin inhibe edilmesinin tespiti sağlamaktadır (Fenech 2000).

MN, ekonomik ve kısa süreli test yöntemi olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Emecen ve Ünlü 1995). 1973'te Heddle tarafından mikronükleus yönteminin sıçan kemik iliğine uygulanmasıyla memelilerdeki kromozomal hasarlar belirlenmeye başlanırken, ilk kez 1976 yılında Countryman ve Heddle tarafından insan lenfositlerinde de uygulanmıştır (Peace and Succop 1999).



Şekil 1.7. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi (Fenech 1993)

MN testinde mikronükleusun tespit edilebilmesi için hücrelerin birinci mitozu geçirmiş ancak sitokinezi gerçekleştirememiş olmaları gerekmektedir. Sitokinezi engellemek için 1985'te Fenech ve Morley, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan sitokalsin-B adlı aktin polimeraz inhibitörünü kullanarak nükleer bölünmeyi durdurmaksızın, sitoplazma bölünmesini bloke etmişlerdir (Fenech and Morley 1985; Falck *et al.* 1997). Bu sayede binükleat hücreler kolaylıkla tespit edilebilmekte ve kültürdeki tek mitoz geçiren hücrelerdeki mikronükleuslar değerlendirilerek tekniğin duyarlılığı büyük ölçüde artırılmıştır (Peace and Succop 1999; Cavallo *et al.* 2005).

MN testi, insan ve hayvanlarda çeşitli dokulara uygulanabilmektedir. Lenfositler, eritrositler, kemik iliği, dil, damak, yanak ve dudakların iç kısmı, idrar kesesi, bronş epitelyumu sıklıkla kullanılan dokulardır (Tucker and Preston 1996). *İn vivo* MN tekniğinde, periferik lenfositlerde mikronükleus uygulaması ile hedef doku toksisitesiyle birlikte total vücut maruziyeti de değerlendirilebilmektedir (Fenech 1993).

MN testinde, donörlerin sigara-alkol kullanımı (Maffei *et al.* 2002), yaş (Thierens *et al.* 1996), cinsiyet (Barale *et al.* 1998), çeşitli kronik ve enfeksiyonel hastalıklar, yaşam tarzı, ilaçlar, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet (Neri *et al.* 2003; Pelevina *et al.* 2005) gibi faktörler mikronükleus oluşumunu etkilemektedir.

1.3. Bitkisel Ekstraktlar Kullanılarak Genotoksisitenin Giderilmesi

Antik çağlardan beri insanlar birçok doğal materyali ilaç olarak kullanmıştır. Bunların içinde bitkiler insan sağlığı bakımından önemli rol oynamıştır. Günümüzde de toksik ajanlara karşı çoğunlukla bitkilerin çay, macun, lapa vb. hazırlanarak tüketilmesi, eskiden olduğu gibi çeşitli hastalıklara ve zehirlenmelere karşı kullanılmaktadır. Alternatif tıbbi bilimsel sisteme oturtan farmakognozi bilim dalı bitkilerden elde edilen etken maddelerle çeşitli ilaçlar hazırlaması prensibine dayanmaktadır (Tanker ve Tanker 1991). Fitoterapi ya da alternatif tıp olarak tanımlanan bu yöntemle kanser tedavisi de dâhil olmak üzere birçok insan ve hayvan hastalıklarının tedavisi yapılabilmektedir (Phillipson and Anderson 1989). Reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Farnsworth *et al.* 1985). Ülkemiz florasında ise 650 bitki türü tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984). Ayrıca çeşitli bitki ekstraktları kullanılarak, genotoksik ajanların canlılar üzerinde oluşturmuş olduğu hasarların giderilmesi üzerine çalışmalar da yapılmaktadır. Özellikle nadir bulunan birçok bitki türünde mutajen ve karsinojen ajanları baskılayan maddelerin bulunduğu bilinmektedir (Bhattacharya 2011). DNA hasarı ve oksidatif stres, kanser ve yaşlanma da dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklar ve patolojik durumlarda önemli rol oynamaktadır (Soltani *et al.* 2009). Çeşitli çalışmalar bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin, oksidatif stresin neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu bir aktivite sergilediğini göstermiştir (Plazar *et*

al. 2008). Yine farklı fitokimyasallar içeren meyve sebzeler, antimikrobiyal, antioksidan, antimitojen ve antikanserojenik etki gösterebilirler (Arora *et al.* 2002; Kızılet *et al.* 2013). 20. yüzyılda tıp biliminin muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen bitkilerin geleneksel tıpta kullanımını halen devam ettirmektedir (Jain *et al.* 2007).

1.3.1. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.)

Portulacaceae (semizotugiller) familyasından olan semizotu (*Portulaca oleracea* L.), küçük ve etli yapraklı, gövdesi ve yaprakları çok fazla su içeren tek yıllık otsu bir bitkidir (Çizelge 1.1 - Şekil1.4). Semizotu genellikle pürüzsüz, kırmızımsı, yere yatık tüysüz gövdeli ve sapsız koyu yeşil yaprak kümelerine sahiptir (Karimi *et al.* 2010). Yaklaşık kırk çeşit varyetesi bulunan bu bitkinin iklim toleransı çok geniş olduğu için yayılış alanı bütün dünya olarak kabul edilmektedir.

Çizelge 1.1. *Portulaca oleracea* (semizotu) bitkisinin sistematigi

Alem:	Plantae (Bitkiler)
Şube:	Angiospermae (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Dicotyledoneae (çift çenekliler)
Takım:	Caryophyllales
Familya:	Portulacaceae
Cins:	<i>Portulaca</i>
Tür:	<i>Portulaca oleracea</i> (semizotu)



Şekil 1.8. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisine ait görüntüler

Günümüzde semizotunun tıbbi bitki olarak kullanımının yanısıra geleneksel ya da yöresel lezzet kaynağı olarak kullanımı da oldukça yaygındır. Semizotunu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) en çok kullanılan tıbbi bitki olarak listelemiş ve “küresel anlamda her derde deva” adını vermiştir (Dweck 2001; Lim and Quah 2007). Yüzyıllardan beri tıbbi bitki olarak kullanıldığı kaydedilen (Dweck 2001), anavatanı Hindistan ve Ortadoğu olan semizotunun soğuk ve sıcaklık toleransından dolayı yabani olarak geniş bir yayılış göstermesinin yanında insan beslenmesindeki yeri ve öneminin daha iyi anlaşılması ve de tıbbi alandaki etkilerinin saptanmış olması dünyanın birçok yerinde kültüre alınmasının başlıca nedenlerini oluşturmuştur (Eryiğit vd 2011). Semizotu, genellikle sulak yerlerde, dere kenarlarında, çayırlarda, sebze bahçelerinde ve su arkları kenarında yabani olarak kendiliğinden yetişen bir bitkidir. Ülkemizde çoğunlukla bu şekilde toplanarak pazarlanmakla birlikte, çok az da olsa bazı yerlerde üretimi de yapılmaktadır (Tunçtürk 2013).

Semizotu büyük miktarda *l*-norepinefrin (*l*-noradrenalin; taze yaprakta %0,25, beyin yorgunluğuna faydalı nörohormon) içermektedir. Diğer yapraklı sebzelere oranla en yüksek omega-3 (0,1 mg/g eicosapentaenoik asit (EPA) yağ asidi içeriğine sahiptir. (Byrne and McAndrews 1975; Kumlay *et al.* 2010). Aynı zamanda semizotu, A, B1,

B2, C, niasinamid, nikotirik acid, α -tokoferol, β -karoten vitaminlerini magnezyum, kalsiyum, potasyum ve demir gibi mineralleri, ayrıca iki tip betalain alkaloid pigmenti olan kırmızımsı betasiyaninler (doğal rengine bulunun gövdede) ve sarı betaksantinsisi (çiçeklerde ve yaprağın hafif sarımsı bölümlerinde bulunun) içermektedir. Bu iki pigment tipinin de etkili bir antioksidant ve antimutajenik olduğu laboratuvar çalışmalarında görülmüştür (Simopoulos 2004). Bunun yanında *Portulaca* cinsi oksalat içeren bitki cinsleri listesinde olup (Clarke *et al.* 1981), %9 oksalik asit bulundurduğu da rapor edilmiştir (Webb 1948).

Çeşitli çevresel kirleticilere bağılı olarak oluşun mutasyonlar, insanda kanserleşme de dahil farklı kalıtsal hastalıklara neden olmaktadır. Son yıllarda yaşamsal aktivitelerimizi devam ettirebilmek için tükettiğimiz gıdaların üretiminden soframıza gelinceye kadar korunmasında kullanılan kimyasal madde miktarı korkunç düzeyde artmıştır. Farklı kimyasal maddeler için WHO'nun belirlemiş olduğu eşik değerlerinin çok çok üzerindeki kullanım miktarları insanların doğal gıdaya ulaşmakta zorlandığını göstermektedir. Diyetle beraber aldığımız çeşitli pestisitler ve grubun farklı kimyasal ürünleri vücudumuzun antioksidan mekanizmasını bozarak çeşitli mutasyonlara yol açabilmektedir. Bu konuda yapılan araştırmalarda depresyondan kansere kadar birçok hastalığın kökeninde antioksidan mekanizmadaki bozulmaların yattığı işaret edilmektedir. Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insanda mutasyon oluşturma potansiyellerinin belirlenmesinde, *in vivo* ve *in vitro* olarak gerçekleştirilen kısa süreli test teknikleri kullanılmaktadır. Bu testler içinde *in vivo* olarak *Drosophila*'da SMART ve insan lenfosit hücre kültürü kullanılarak yapılan KKD ve MN testleri hemen her laboratuvarda yapılabilmektedir. Bu çalışmada da çeşitli insektisitlerin olası mutajenik etkileri bu üç test tekniğı kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. İnsektisitlerin olası genotoksik etkilerinin giderilmesi ve antioksidan potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla da halk arasında sıklıkla kullanılan semizotu bitkisine ait metanol ve su ekstraktlarının antioksidan potansiyellerinden faydalanılarak, bitkinin antigenotoksik etkisinin SMART, KKD ve MN testleri ile ayrı ayrı tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

1920'den beri kullanılan ve geliştirilen genotoksisite testleri, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır (Vural 2005). *In vitro* ortamda insan lenfosit kültürü kullanılarak yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinden kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile *in vivo* olarak yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), kimyasal maddelerin çeşitli canlı gruplarında ve özellikle insanlarda mutasyon oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu konuda daha önce çeşitli organizmalar, farklı pestisit grupları ve bitki türlerine ait ekstraktlar ile yapılmış olan çalışmalar kendi içinde kronolojik sıra ile verilmiştir.

Genotoksisite testlerinde temel amaç, kimyasal maddelerin genotoksik potansiyelini belirlemek ve genotoksisitesi belirlenen ajanın etkisi eğer giderilmek isteniyorsa kullanılacak antigenotoksik maddeleri ve bu maddelerin etken dozlarını tespit etmektir. Genotoksik olabilecek kimyasal maddelerin belirlenmesinde çeşitli test sistemleri kullanılırken antigenotoksik ajanların belirlenmesinde kullanılan az sayıda test sistemi vardır. Bu test sistemlerinden birisi de *Drosophila*'nın kullanıldığı *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testidir ve çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanması için oldukça uygun ve etkili bir test sistemi olarak günümüzde de hala geçerliliğini korumakta ve sıklıkla kullanılmaktadır (Graf *et al.* 1984).

Ancak her test sisteminin farklı mekanizmaları hedef alarak çalışması sebebiyle bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerekmektedir (Houk 1992).

Frei and Würgler (1996) tarafından, *in vivo* SMART yönteminin, mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo/in vitro* genotoksisite test sistemleriyle bağlantı oluşturabileceği bildirilmiştir.

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır (Choy 2001; Young 2002). Son yıllarda *Drosophila*'ya ait genom sekansı elde edilmiş ve insanlarda görülen hastalıklara neden olan %60'tan fazla genin *Drosophila* genomunda bulunması bu türe model bir organizma özelliği kazandırmıştır (Bernards and Hariharan 2001). Günümüzde de genetik toksikoloji alanında bu özelliğinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır.

Kardeş kromatid değişimi (KKD), bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır (Latt *et al.* 1981).

Kelsey *et al.* (1990)'a göre, pestisit, insektisit ve petrol ürünleri gibi kimyasal ajanlara maruziyet sonrası çeşitli canlı gruplarında KKD frekansı değişmektedir.

Periferal lenfositlerde *in vivo* mikronükleus (MN) uygulaması ile hedef doku toksisitesiyle birlikte total vücut maruziyeti de değerlendirilebilmektedir (Fenech 1993).

MN, ekonomik ve kısa süreli test yöntemi olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş ve yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Emecen ve Ünlü 1995). Bu yöntem ile kimyasal ve fiziksel ajanların memelilerde klastojenik (DNA'da yapısal hasar meydana gelmesi) ve anöjenik (DNA'da sayısal hasar meydana gelmesi) aktivitelerinin belirlenmesi sağlanmaktadır (Kirsch-Volders *et al.* 1997; Cicchetti *et al.* 1999).

Genotoksikoloji testlerinde mutajenik etkisi sıklıkla araştırılan pestisitler, tarımda zararlı hayvanlara, yabancı otlara ve hastalıklara karşı geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Aynı zamanda hayvansal üretim sürecinde onları etkileyebilecek birçok iç ve dış parazite karşı ve halk sağlığını korumak için karasinek, sivrisinek ve ev böceklerine karşı da kullanılmaktadırlar. Pestisitler, farklı alt grupları ile farklı türlere özgü olarak üretilmişlerdir (Greene and Pohanish 2005; Yıldız vd 2005).

Bu alt gruplardan sentetik insektisitler, insan eliyle üretilen ekolojik zararlı kimyasallardır. Bunların potansiyel sinerjistik ve antagonistik etkileri insanlarda tam olarak belirlenememiştir (Demsia *et al.* 2007).

İnsektisitlerin kimyasal gruplarından olan ve bu çalışmada kullanılan piretroidler, memelilerde toksik olarak kabul edilmezler. İnsanlarda letal oral dozu 70 kg insan için 50 g olarak belirlenmiştir. Ancak kapalı ortamlarda kullanılmaları durumunda insanlar üzerindeki toksik etkilerinin daha yüksek olacağı da Vural (2005) tarafından bildirilmiştir. Bir diğer insektisit grubu olan neonikotinoidler de, organofosfat, karbamat ve piretroid insektisitlere karşı zararlı direncinin gelişmesi nedeniyle, direnç geliştiren birçok önemli zararlının kontrol edilmesinde etkilidir. 2008 yılında da bu yeni insektisit grubunun dünya insektisit piyasasının %24'ünü oluşturduğu Jeschke *et al.* (2011) tarafından bildirilmiştir.

Bu konuda yapılan çalışmalardan bazıları kronolojik olarak şöyledir;

Vigfusson *et al.* (1983) *Umbra limi* (çamur balığı)'nin akvaryum suyuna eklenen endrin, klordan, diazinon ve guthion insektisitlerinin kardeş kromatid değişimini arttırdığını belirlemişlerdir.

Dimetoat'ın, fare kemik iliğinde kromozomal anomalilere neden olduğu (Athwal and Sandhu 1985), hamster hücrelerinde KKD'yi yükselttiği ve *Drosophila*'da mutajen olduğu bildirilmiştir. Benomil ise, kültüre alınmış memeli hücrelerinde anöploidi

oluşturmakta (Rainaldi *et al.* 1987), *in vivo* rat kemik iliğinde yüksek dozda kromozomal anomalilerine yol açmaktadır (Adhikari and Grover 1988).

Piretroid insektisit grubuna dahil olan asefat, metomil ve permetrin (PER) gibi insektisitler ile yapılan toksisite çalışmalarında bu insektisitlerin tümünün yaprak biti olarak bilinen *Myzus persicae*'nin ergin bireylerinde yaşam süresini kısalttığı gözlenmiştir (Hsieh and Allen 1986).

Gomez-Arroya *et al.* (1987) tarafından organofosfatlı insektisitlerden metil paration, dimetoat, phoksim ve metil azinfos ile yapılan KKD çalışmasında, metil paration, dimetoat insektisitlerinin insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimini kontrol grubuna göre artırdığı ve istatistiksel olarak pozitif sonuç gözlemlendiği bildirilmiştir. Ancak phoksim ve metil azinfos'ta ise genotoksik etkiye rastlanmamıştır.

Bir başka piretroid insektisit olan deltametrinin 10, 15 ve 20 mg/kg dozlarda 24, 30 ve 35 saat boyunca intraperitonal uygulanmasının albino erkek farelerde, sperm ve kromozom anomalilerine sebep olduğu ayrıca mikronükleus oranlarını önemli derecede artırdığı da belirlenmiştir (Bhunya and Pati 1990).

Surrallés *et al.* (1995) tarafından, beř farklı piretroid insektisit olan sipermetrin, deltametrin, fenpropatrin, fenvelerat ve PER'in, *in vitro* tam kan ve lenfosit kültüründe MN oranını artırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak zayıf genotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir.

Osaba *et al.* (1999), piretroid ailesinden alletrin, klorlu hidrokarbonlulardan dieldrin ve endrin ile organofosfatlardan dimenthoat ve malation insektisitlerinin genotoksik etkilerini araştırmış ve yüksek bioaktivasyona sahip *Drosophila* ırklarının çaprazlanmasıyla yapılan SMART sonucunda beş insektisiti de negatif genotoksik etkili bulmuşlardır.

Neonikotinoidlerden imidakloprid (İMİ)'e maruz kalan (0,2-0,5 mg/kg doz aralığında) *Eisenia fetida* (toprak solucanı)'da sperm anormalliği, doz artışına bağlı olarak önemli derecede artmıştır (Zang *et al.* 2000).

Lucero *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, tarımsal ilaçlama yaparken İMİ'ye maruz kalan tarım işçilerinde MN oranının arttığı belirlenmiştir.

Ancak *Vicia faba* (bakla)'da yapılan MN testinin sonuçlarına göre, İMİ'nin 12,5-100 mg/ml konsantrasyon aralığında kontrole göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmadığı da tespit edilmiştir (Zang *et al.* 2000).

Stapel *et al.* (2000), Amerika Birleşik Devletleri'nde pamuk arazilerine düzenli olarak uygulanan aseptat ve İMİ insektisitlerinin, pamuk paraziti olan *Microplitis croceipes* dişilerinde ömür uzunluğunu azalttığını ve insektisit uygulanmasından sonra 2-18 günlük periyotta parazitoidin konak arama yeteneğinin azaldığını bulmuşlardır.

All *et al.* (2001) arazi ve sera çalışmaları ile İMİ'nin bir mısır kurdu olan *Helicoverpa zea* üzerinde ovisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Parrish *et al.* (2001)'a göre de, bir çeşit neonikotinoid olan asetamipritin (ASE) yine *Helicoverpa zea*'da yumurta verimini düşürücü etkisi azdır.

Colpoclypeus florus ve *Trichogramma platneri* ektoparazit böceklerine topikal (deriye uygulanan) İMİ uygulamasında yüksek akut toksisite belirlenirken, bir günlük kısa oral maruziyette toksik etki olmadığı belirlenmiştir (Brunner *et al.* 2001).

Altuntas and Delibas (2002)'a göre, piretroid insektisitlerden olan fastak, nükleer hasarlara, reaktif oksijen ve azot türevlerinin hücre içinde birikimlerine neden olmaktadır.

Pestisitlerin bir grubu olan fungusitlerden kaptan ve kaptafolun akut ve kronik beslenme sonucu *Drosophila* üzerine genotoksik etkileri SMART ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre akut beslenmede kaptan ve kaptafol 10-100 mM, kronik beslenmede ise kaptan 2,5 ve 5 mM konsantrasyonlarında küçük tek tip ve toplam klonlarda pozitif etkili sonuçlar göstermiştir (Rahden-Staron 2002). Kaptan, maneb, maneb'in türevi olan zineb ve etilenetiyoüre (ethylenethiourea) (ETU) gibi değişik fungusitlerin uygulandığı *Drosophila melanogaster*'in standart ve yüksek bioaktivasyon ırklarında, SMART ile genotoksiteleri belirlenmiş, kaptan ve zineb herhangi bir genotoksik etki göstermezken, manebin sadece standart çaprazlamada, ETU'nun ise standart ve yüksek aktivasyon ırklarının her ikisinde de genotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (Osaba *et al.* 2002).

Rana limnocharis ve *Rana hallowell*'in iribaşları için İMİ uygulamasından sonra MN frekansı bakımından kontrol ile uygulama grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Comet analizinde de İMİ'nin 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,5 mg/L konsantrasyonları ile muamele edilen grupta eritrosit DNA hasarlarında artış meydana geldiği gözlenmiştir (Feng *et al.* 2004).

Çakır ve Sarıkaya (2004), danizinin, diklorvos, metil paration ve azametifos insektisitlerini *D. melanogaster*'in 3. evre larvalarına pupadan çıkana kadar uygulamışlardır. Sonuç olarak ömür uzunluğunu azaltıcı ve mortalite oranını artırıcı etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

0,1 mg/L İMİ'nin *in vitro* olarak insan periferik kan lenfositlerine uygulanmasından sonra MN ve KKD frekansında meydana gelen artış, negatif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Yine comet analiz ile de DNA hasarlarının dağılımı incelenmiş ve İMİ uygulanmış tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gözlenmiştir (Feng *et al.* 2005).

Proenca *et al.* (2005) tarafından İMİ zehirlenmesi nedeni ile ölen insanlarda yapılan otopsielerde, insan dokularında likit kromatografi/kitle spektrofotometrisi ile

örneklemeler yapılmış ve hemen tüm organ ve dokularda İMİ ve metaboliti saptanmıştır.

Budak (2005)'ın yaptığı bir araştırmada, piretroid insektisitlerden PER'in *D. melanogaster*'de toksik ve genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Erkek farelerle yapılan başka bir çalışmada da, Prasanthi and Rajini (2005) tarafından fenvaleratın (bir çeşit piretroid insektisit) oksidatif hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

Kim *et al.* (2006)'a göre, ASE *Deraeocoris brevis*'in erginleri üzerine akut, nimfleri üzerine ise orta derecede toksik etki göstermektedir.

Yao *et al.* (2006) tarafından, ASE'nin üç bakteri türünde (*E. coli* K12, *Pse.FH2* ve *B. subtilis*) süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesini kısa bir süre için arttırdığı saptanmıştır.

Yine bir çeşit nenikotinoid insektisit olan ASE insan periferik lenfosit hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda MN ve KKD frekansını, kontrol grubu ve çözücü kontrol grubuna göre önemli derecede artırmıştır. Mitoz bölünme indeksi ise düşmüştür (Yavuz Kocaman 2007).

Fernandes *et al.* (2007), piretroidlerin eritrositlerde şekil bozuklukları ve binükleus gibi çeşitli morfolojik değişimlere neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu morfolojik değişimler mitokondrideki oksidatif strese kaynaklanmakta ve hücrede apoptotik değişimler gerçekleşmektedir. Böylece kromozom anomalileri ve anöploidi gibi nükleer hasarlar gözlenmektedir.

Yine piretroid insektisitlerden birisi olan sipermetrinin, *D. melanogaster*'in çeşitli gelişim evrelerinde toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Karataş and Bahçeci 2008).

Abou-Donia *et al.* (2008), neonikotinoid olan İMİ insektisitini, Sprague-Dawley sıçanlarına gebeliğin 9. gününde intraperitoneal olarak uygulamışlar ve bu bireylerden doğan 30 günlük yavruların beyin dokusunda asetilkolinesteraz enzim (AChE) aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir. Dolayısıyla bu maddenin nörotoksik etkilere katkıda bulunabileceğini de bildirmişlerdir.

Scollon *et al.* (2009), içinde PER ve BİF'in de bulunduğu çeşitli piretroid insektisitlerle yaptıkları metabolizma çalışmasında, özellikle PER ve BİF'in insan ve sıçan hepatik mikrozomlarında oksidasyona neden olduklarını gözlemiştir.

İnsektisitlerin sinerjist etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, PER ve diklorvos veya phoxim karışımı ile BİF ve diklorvos veya phoxim karışımının ayrı ayrı olmak üzere zebra balıklarında çok yüksek toksisite gösterdiği belirlenmiştir (Zhi-Yong *et al.* 2009).

Piretroid insektisitlerin memelilerde toksik etkilerinin düşük olmasına rağmen, yapılan deneysel çalışmalarda ratlarda burun mukozası, akciğer, karaciğer, lenfoid dokular, timus gibi dokular üzerinde patolojik değişikliklere ve yine kanda oksidatif stresi işaret eden enzim düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır (Doğruman vd 2000; Ünal vd 2009).

Kocaman ve Topaktas (2010), piretroid insektisitlerden sipermetrinin, MN, KKD ve kromozomal aberasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Sankar *et al.* (2010), piretroidlerle yaptıkları MN testinde ise bazı kromozomların ya tamamı ya da fragmentlerinin çekirdek bölünmesi sonrası çekirdek dışında kalarak MN'leri oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Dondero *et al.* (2010), *Mytilus galloprovincialis* (akdeniz midyesi)'in solungaç dokusunda, sadece İMİ uygulamasında AChE aktivitesinin azaldığını, sadece tiakloprid (THİ) uygulaması ya da İMİ+THİ neonikotinoid insektisitlerinin beraber uygulanmasında ise AChE aktivitesinin arttığını gözlemlemiştir.

Gervais *et al.* (2010)'a göre, neonikotinoidler nikotin gibi, hücrelerdeki nikotinic asetilkolin reseptörlerine bağlanıp, asetilkolinesteraz birikimine neden olarak paralize ve sonuçta böceğin ölümüne neden olurlar.

Piretroid insektisitlerden olan fastak, *Odontophrynus cordobae* ve *Rhinella arenarum* kurbağa iribaşlarına uygulanmış ve onların eritrositlerinde klastojenik etki göstererek mitotik süreci bozmuştur (Bosch *et al.* 2011).

Bu çalışmanın ikinci aşamasında, semizotu bitkisine ait metanol ve su ekstraktı kullanılmıştır. Semizotu gibi çeşitli bitkiler ve fitokimyasallar antioksidan etkileri nedeniyle genotoksik ajanlara karşı antigenotoksikoloji testlerinde sıkça kullanılmaktadır. Farklı bitkilere ait ekstraktlar ve fitokimyasallar ile daha önce yapılan çalışmalardan bazıları da şöyledir;

Farelerde Ehrlich solid tümörü üzerine yapılan çalışmada, *Capsella bursa-pastoris* (çobançantası)'e ait çeşitli ekstraktların, bu tümörün gelişimini inhibe ettiği Kuroda *et al.* (1976) tarafından belirlenmiştir.

Alternatif tıbbi, bilimsel sisteme oturtan farmakognozi bilim dalı bitkilerden elde edilen etken maddelerle çeşitli ilaçlar hazırlaması prensibine dayanmaktadır (Tanker ve Tanker 1991). Fitoterapi ya da alternatif tıp olarak tanımlanan bu yöntemle kanser tedavisi de dahil olmak üzere birçok insan ve hayvan hastalıklarının tedavisi yapılabilmektedir (Phillipson and Anderson 1989).

Graf *et al.* (1998), SMART yöntemini kullanarak işlenmiş kahvenin antirekombinojenik özellikte olduğunu, fakat antimutajenik aktiviteye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, metil üre ile sodyum nitrit'in beraber oluşturdukları nitrozasyona karşı askorbik asit ve katesin'in koruyucu etkilerinin olduğu sonucuna da varılmıştır.

Karekar *et al.* (2000), aflatoksin B1'in mutajenik etkilerini E vitamini, kafeik asit ve glutatyon kullanarak gidermeye çalışmışlardır. E vitamininin herhangi bir antimutajenik

etkisi görülmezken, kafeik asit ve glutatyonun antimutajenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada antigenotoksik etkisini belirlemek için kullanılan semizotunu, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) en çok kullanılan tıbbi bitki olarak listelemiş ve “küresel anlamda her derde deva” adını vermiştir (Dweck 2001).

Semizotu su ekstraktı, Ames testinde TA98 ve TA100 soylarında, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] kinolin mutajenine karşı zayıf antimutajenik etki göstermiştir (Yen *et al.* 2001).

Yine aynı yazar ve çalışma grubu tarafından insan lenfositlerinde kinolinin neden olduğu mutajeniteyi semizotu su ekstraktının giderdiği bildirilmiştir (Yen *et al.* 2001).

Metil üre ve sodyum nitrat ile uyarılan genotoksik etki, pablano yeşilbiberi (*Capsicum spp.*) püresiyle beslenen standart ve yüksek biyoaktifiteli *Drosophila* varyetelerinde %40 ve %80 oranında giderilmiştir. Bu etkinin, yeşilbiberin içerdiği klorofil, β -karoten ve birçok vitamin gibi antimutajenik ve/veya antikarsinojenik özellikteki bileşikleri içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Ramirez-Victoria *et al.* 2001).

Hunt *et al.* (2001) *Hypericum perforatum* (sarı kantaron) ekstraktından oluşan ticari hiperisin tabletlerinin insan plasenta vasküler dokusunda serbest radikal üretimini engellediğini tespit etmişlerdir.

Idoamar *et al.* (2002), üç tıbbi bitki çeşidinden *Helichrysum italicum*, *Ledum groenlandicum* ve *Ravensara aromatica*'nın uçucu yağlarının etkilerini SMART ile araştırmışlar ve antigenotoksik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Etkisi iyi bilinen genotoksik ajanlardan, etil metansülfonat (EMS), metil metansülfonat (MMS) ve N-nitrozo N-etilüre (ENU) ile birlikte uygulanan askorbik asitin tavsiye

edilen günlük dozuna göre hesaplanan konsantrasyonu, SMART'da üç mutajenin de genotoksik etkisinin azalmasında etkili olmuştur (Kaya 2003).

Pestisit zehirlenmelerinde üretilen serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidatif stresin lipid peroksidasyonunu arttığı bildirilmektedir (Oruç and Üner 2000; Hazarika *et al.* 2003).

Ericaceae (Fundagiller), Fumariaceae (Şahtereotugiller) ve Caesalpiniaceae familyasındaki 21 çeşit tıbbi bitkinin kloroform: metanol (1:1) ekstraktlarından Fundagiller familyasına ait olanlar asetilkolinesterazı, Şahtereotugiller ve Caesalpiniaceae familyasına ait olan bitkilerin ise bütirilkolinesterazı yüksek oranda inhibe ettikleri belirlenmiştir (Orhan *et al.* 2004).

Ziziphora clinopodioides (kekik) metanol ekstraktının güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve radikal süpürücü etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Salehi *et al.* 2005).

Panovska *et al.* (2005) *Teucrium montanum* (yermeşesi)'un *in vitro* antioksidan kapasitesinin olduğunu ve bu bitkiye ait ekstraktların doğal antioksidan olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Romero-Jiménez *et al.* (2005), yaptıkları çalışmada hidrojen peroksit (H₂O₂) ile uyarılan genotoksik etkinin giderilmesi için *Mentha piperita* (nane), *Mentha pulegium* (yarpuz), *Tilia cordata* (ıhlamur), *Uncaria tomentosa* (kedi pençesi), *Matricaria chamomilla* (papatya) ve *Valeriana officinalis* (kediotu) gibi bitkilerin SMART ile antigenotoksik etkilerini araştırmış ve bu bitkilerin hidrojen peroksitin genotoksik etkilerini giderdiğini gözlemiştir.

Alternatif tedavi amacı ile kullanılan şifalı bitkiler, çeşitli canlılarda gözlenebilecek dezavantajların giderilebilmesi için antioksidanlar ve Reaktif Oksijen Türlerini (Reactive Oxygene Species/ROS) süpürücü moleküllerin potansiyel kaynağı olarak bilinmektedir (Arora *et al.* 2005).

Halk arasında sıklıkla kullanılan *Teucrium polium* (mayasıl otu)'un ratlarda *in vivo* ve *in vitro* ortamda güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir (Ljubuncic *et al.* 2006; Hasani *et al.* 2007).

Teucrium orientale'den izole edilen luteolin 7-O-rutinozidin güçlü bir radikal süpürücü olduğu Çakır *et al.* (2006) tarafından bildirilmiştir.

Farklı pestisit grupları gibi insektisitler de, serbest radikal oluşturmakta ve ROS temizleyen enzimlerin yapısında da değişiklik meydana getirerek oksidatif stres oluşumuna sebep olmaktadır (Dettbarn *et al.* 2006; Giordano *et al.* 2007).

Lim and Quah (2007), Malezya'da bulunan semizotu türüne ait 6 ırkla yaptıkları antioksidan aktivite ölçümlerinde, tüm varyetelerin yüksek radikal süpürücü ve antioksidan özelliklerinin olduğunu göstermişlerdir.

Costa *et al.* (2007) *Portulaca hirsutissima* ve *Portulaca werdermannii* semizotu türlerinden elde ettikleri etil asetat ve kloroform ekstraktlarının, lenfosit çoğalma testiyle Leişman ve Amerika tripanozomiyazı (chagas) hastalıklarına karşı kullandıkları çalışmada, her iki bitkinin de immünmodülatör ve leişman hastalığını önleyici aktivitelerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Çeşitli çalışmalar bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin, oksidatif stresin neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu bir aktivite sergilediğini göstermiştir (Plazar *et al.* 2008).

Demir *et al.* (2008a, 2008b) tarafından da ultraviyole (UVB) radyasyonuna karşı klorofilin, klorofil-a ve klorofil-b bileşiklerinin antimutajenik etkisinin olduğu gözlenmiştir.

Matkowski *et al.* (2008)'a göre, *Salvia przewalskii* (ada çayı)'nın kökleri ve yapraklarından hazırlanan metanol ekstraktları güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir.

Kılıçgün (2008) tarafından *Rosa canina*'nın düşük konsantrasyonlarda bile sıçanlarda karaciğer hasarını inhibe ettiği bildirilmiştir.

Soysal vd (2008) antioksidan etkileri iyi bilinen maddelerden melatonin, β -karoten ve genotoksik bir madde olan Mitomisin C (MMC)'nin *in vitro* ortamda insan periferel lenfosit kültürlerinde KKD üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve sonuç olarak melatonin ve β -karotenin MMC'nin KKD indükleyen etkisini azalttığını belirlemişlerdir.

Apis mellifera (bal arısı)'dan elde edilen propolis su ekstraktı, genotoksik etkileri bilinen bir kemoterapi ajanı olan doxorubicin (DXR) ile birlikte uygulandığında, yalnızca DXR ile muamele edilmiş gruba göre SMART'da rekombinasyon oranında önemli düşüş göstermiştir (Valadares *et al.* 2008).

Hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasarlara karşı *Usnea longissima* likeninin sahip olduğu çeşitli asitlerin, *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarına ait ortalama ömür uzunluklarını kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir (Uysal vd 2008).

Yine *Lobaria pulmonaria* likeninin metanol, kloroform ve su ekstraktlarına maruz bırakılan *D. melanogaster*'in erkek ve dişi popülasyonlarında ömür uzunluğunun konsantrasyon artışına paralel olarak yükseldiği gözlenmiştir (Uysal vd 2009).

Demir *et al.* (2009), genotoksik etkileri iyi bilinen potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$), kobalt klorid ($CoCl_2$), etilmetansulfonat (EMS), and N-etil-N-nitrosourea (ENU) gibi çeşitli mutajenlere karşı *Citrus aurantium* (Turunç)'un meyve kabuğu yağı ekstresinin antigenotoksik etkilerini SMART ile belirlemeye çalışmışlardır. Elde edilen bulgulara göre, mutajenlerin oluşturdukları kanat spotlarında oluşan frekans artışı, önemli düşüş göstermiştir.

You Guo *et al.* (2009)'un bildirdiğine göre, semizotunda bulunan polisakkaritler, süperoksit anyonlarını, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini önemli derecede süpürebilmekte ve bu polisakkaritler T ve B lenfositlerinin çoğalmasını da artırabilmektedir.

Chen *et al.* (2009) hipoksik farelerde semizotu etanol ekstraktının solunum metabolizmasında glikolizin önemli enzimlerinin aktivitesini ve ATP oranını artırdığını belirlemişlerdir.

Dkhil *et al.* (2011) ratların karaciğer, böbrek ve testislerinde yaptıkları çalışmada ise semizotunun glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S transferaz, glutatyon perosidaz ve glutatyon düzeyini artırdığını, yine bu çalışmada semizotunun MDA ve nitrit/nitrat oranını düşürerek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Ramos *et al.* (2010) tarafından *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa* ve *Salvia lavandulifolia* ekstraktlarının temel bileşenleri olan rosmarinik asit ve luteolin-7-glukozidin, oksidatif ajanlarla indüklenmiş Caco-2 ve HeLa hücre DNA'larını oksidatif hasarlara karşı koruduğu ve DNA onarımını uyardığı bildirilmiştir.

Folkes *et al.* (2011)'ye göre, semizotu içerdiği askorbik asit ve glutatyon ile nükleik asitlerde ve DNA'da hasara neden olan peroksidanları ve serbest radikalleri süpürürken bu radikallerin üretimlerini de azaltmaktadır.

Behravan *et al.* (2011), insan lenfosit hücrelerinde çeşitli oksidatif ajanların neden olduğu DNA hasarlarını, semizotu su ekstraktı ile önemli ölçüde gidermişlerdir.

Leishmania major parazitiyle enfekte edilen farelerde yükselen gama interferon seviyesi ve lenf nodlarındaki nekroz, *Echium amoneum* (İran borajı)'un su ve etanol ekstraktı ile giderilmiştir (Hosseini and Abolhassani 2011).

Çeşitli araştırmacılara göre, fitokimyasalları içeren meyve sebzeler, antimikrobiyal, antioksidan, antimitojen ve antikanserijenik etki gösterebilirler (Arora *et al.* 2002; Kızılet *et al.* 2013).

Kızılet *et al.* (2013), *D. melanogaster*'de bir çeşit genotoksik ajan olan EMS'nin uygulamasından sonra oluşan genetik hasarın, *Rosa canina* (kuşburnu) etanol ekstraktı ile giderildiğini tespit etmişlerdir.

Hücre içerisinde insektisitler gibi farklı toksik maddeler de hücresel bileşenlerin elektron alma/verme gibi redoks döngülerine (geri dönüşümlü oksidasyon yoluyla) girerek ROS seviyesini yükseltebilirler. Hücre metabolizmasında glutatyon gibi indirgeyicilerin rezervlerini tüketebilir ve sonuçta antioksidan potansiyelini düşürebilirler. Antioksidan ve antioksidan potansiyeline yol açan enzimleri aktive edebilirler. Enerji sağlayan süreçlere müdahale ederek detoksifikasyon ve metabolizma için gerekli kaynakları azaltabilirler. Buna bağlı olarak da transkripsiyon ve translasyon gibi temel yaşamsal süreçlerdeki değişimler dolaylı yoldan ROS düzeyini artırabilir (Stara *et al.* 2013).

Insektisitlerin oluşturduğu sinir ve endokrin sinyallerdeki kesintiler, hücre içinde Ca^{+2} değişimine neden olmaktadır. Böylece oksidatif strese neden olan nitrik oksit sentaz gibi proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikallerin üretilmesinde artış meydana gelmektedir (Kaymak vd 2014).

Sitoplazmada artan Ca^{+2} , inaktif durumdaki Ca^{+2} bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu kırılmaların da 180 baz çifti ve katları şeklinde gerçekleştiği Berliocchi *et al.* (2005) tarafından belirlenmiştir.

Kasımoğlu and Uysal (2014) tarafından yapılan bir başka çalışmada da insan lenfosit hücrelerine uygulanan sipermetrin ve fenvalerat insektisitlerinin oluşturduğu genotoksik

hasarın yine *Rosa canina* bitkisine ait su ve etanol ekstraktları ile giderildiği bildirilmiştir.

Drosophila'da kanat SMART yöntemi ile genotoksik testlerde pozitif kontrol grubu olarak sıklıkla kullanılan EMS'nin mutajenik etkisi, *Echium amoenum* metanol ekstresi kullanılarak düşürülmüştür (Uysal *et al.* 2015).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, ülkemizde ve dünyada yoğun olarak kullanılan insektisitlerin ökaryotik hücrelerdeki olası genotoksik etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* yöntemler ile belirlenerek, bu etkilerin giderilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla belirlenen dört farklı insektisit (Bifentrin, Permetrin, İmidakloprid, Asetamiprid) genotoksik etkileri *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART), insan periferall lenfosit hücre kültürlerinde Kardeş Kromatid Değişim Testi (KKD) ve Mikronükleus Testi (MN) ile belirlenerek, bu etkiler semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin metanol (PO_{met}) ve su ekstraktları (PO_{su}) ile giderilmeye çalışılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. *In vivo* ve *in vitro* testlerde kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmamızda olası genotoksik etkilerini araştırdığımız dört farklı insektisit (Bifentrin, Permetrin, İmidakloprid, Asetamiprid) ve çözücüleri olan dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich şirketinden temin edilmiştir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* testlerde kullandığımız kimyasal maddeler, Çizelge 3.1'de toplu halde verilmiştir. Çizelge 3.2'de SMART için larva üretilirken kullanılan *Drosophila* Lewis besin ortamının içeriği, Çizelge 3.3'de kanat preparatlarını hazırlamak için Negishi *et al.* (1988) ve Schaik and Graf (1991)'in çalışmalarında kullanılan "Faure solüsyonu" (Çizelge 3.4) ise *in vitro* test için kullanılan ve Biochrom firması tarafından üretilen (Chromosome Medium B Cat No. F 5023) kromozom medyumununun her 100ml'sinde bulunan madde ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

TEST TEKNİĞİ	KİMYASAL MADDE	FİRMA ADI
SMART (<i>in vivo</i>)	<i>Drosophila</i> besiyeri	Carolina Bio. Supp.
	Agar agar	Merck
	Dietil eter	Merck
	Propionik asit	Merck
	Gliserol	Merck
	Kloral hidrat	Merck
	Arap zankı	Sigma
	Etil metansülfonat	Sigma
	Sodyum hidroksit	Merck
	Entellan	Merck
KKD ve MN (<i>in vitro</i>)	Kromozom medyumu (Çizelge 3.4)	Biochrom
	Kolşisin	Gibco
	Potasyum klorür	Merck
	Glasiyal asetik asit	Sigma
	Sodyum klorür	Merck
	Metanol	Sigma
	5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU)	Sigma
	Sodyum hidrojen fosfat	Fluka
	Potasyum dihidrojen fosfat	Fluka
	Sodyum sitrat	Merck
	Sitokalazin B	Sigma
	Giemsa boyası	Merck
	Hoechst 33258 boyası	Sigma
İmmersion yağı	Merck	

Çizelge 3.2. *Drosophila* Lewis besin ortamının içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Agar agar	9g
Toz şeker	60g
Bira mayası	19g
Mısır unu	50g
Propionik asit	3,5mL
Saf su	565mL

Çizelge 3.3. Faure solüsyonunun içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Gam arabik	30g
Gliserol	20mL
Kloral hidrat	50g
Distile su	50mL

Çizelge 3.4. Kromozom medyumunun her 100ml'sinde bulunan madde ve miktarları

MADDE	MADDE MİKTARI
Minimum Esansiyel Medyum (MEM)	85mL
Fetal Bovine Serum (FBS)	15mL
Heparin	2500U
Penisilin G (sodyum tuzu)	7500U
Streptomisin sülfat	5mg
Fitohemaglutinin L	0,25mg
Askorbik asit	0,50mg
Glutasyon redüktaz	0,50mg

3.1.2. İnsektisitler

Sigma-Aldrich şirketinden temin edilen insektisitler (BİF için CAS numarası: 82657-04-3, PER için CAS Numarası: 52645-53-1, İMİ için CAS numarası: 13826-41-3 ve ASE için CAS numarası: 135410-20-7) somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılmak üzere önce %1 DMSO'da çözülmüş ve 10 ppm stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltilerden uygulama dozları seyreltilerek alınmış ve besiyerlerine katılmıştır. KKD ve MN testleri için ise tüm insektisitler bu kez %2 DMSO'da çözülmüştür. BİF, PER, İMİ'in 500 ppm, ASE'nin ise 250 ppm stok çözeltileri hazırlanarak uygulama dozları bu stoklardan seyreltilerek kullanılmıştır. İnsektisitlerin yarılanma ömürlerine göre stok çözeltiler belirli aralıklarla yenilenmiş ve taze hazırlanan çözeltiler ile deneyler tekrarlanmıştır.

3.1.3. SMART’da kullanılan organizma ile ilgili genel bilgiler

Halk arasında meyve sineği veya sirke sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*, Diptera takımına ait tam başkalaşım geçiren (holometabol) yabancı tip (wild type = w.t.) bir sinek türüdür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *D. melanogaster*'in Oregon R soyu (yabancıl tip) erkek ve dişi bireyleri
D: Denge (Halter) organı

Hayat devri kısa olan *Drosophila*, yumurtadan çıktıktan sonra yaklaşık 9-10 günde erginleşir ve yeniden üremeye başlar. *Drosophila* popülasyonu laboratuvarında kolayca yetiştirilebilir. Kolayca temin edilebilecek malzemeler kullanılarak hazırlanan besi ortamları, araştırmacıya fazla bir maddi külfet getirmez. Ayrıca, *Drosophila*'lar ile yapılan bir çaprazlama sonucunda, bir dişi birey günde 40-50 yumurta bırakır. Bu, 10 günlük bir sayım sonucunda toplam 400-500 birey demektir. Yani, bir defada oldukça fazla sayıda döl elde edilir. Bir nesilde elde edilen birey sayısının fazla olması, onun genetiksel özellikleriyle ilgili bilginin doğru tespit edilmesi ve sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir. Çaprazlamanın özelliğine bağlı olarak özel ata soylar seçilip

eşleşmeleri sağlanır ve elde edilen yavru bireylerin kayıtları birkaç nesil dikkatle kaydedilip, çıkan sonuçlara göre ilgilenilen özelliğin kalıtımı hakkında bir sonuca varılabilir.

Genetik denemelerde kullanılan organizmalarda, belirgin varyasyonlar görülmelidir. *Drosophila* çok çeşitli doğal ya da yapay varyasyonların gözlenebildiği bir organizmadır. Bu varyasyonları taşıyan mutant bireylerde göz rengi, göz şekli, kıl tipi, vücut rengi, kanat şekli açısından farklı fenotipik özellikleri görebilmek mümkündür. Bu tip zıt karakterleri çıplak gözle ya da binoküler mikroskop altında incelemek oldukça kolaydır. Promutajen ve prokarsinojenleri test etmek için, ayrıca metabolik aktivasyona gerek yoktur (Graf and Singer 1992).

1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik araştırmalarda kullanılan *D. melanogaster*, 1927 yılında Müller'in geliştirdiği eşeye bağlı resesif letal test ile genotoksik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda *Drosophila*'ya ait genom sekansı elde edilmiş ve insanlarda görülen hastalıklara neden olan %60'tan fazla genin *Drosophila* genomunda bulunması bu türe model bir organizma özelliği kazandırmıştır (Bernards and Hariharan 2001).

Bu özelliklerden başka, *Drosophila*'nın diğer bir avantajı, mitotik kromozomlardan kolayca ayırt edilebilen ve özellikle larvaların tükrük bezi hücrelerinde görülebilen dev kromozomları (=politen kromozom) taşımasıdır. Bu kromozomlar, sitogenetik olarak, kromozom haritaları ve kromozom fonksiyon analizlerinin yapılmasını sağlar.

Çalışmada kullanılan *in vitro* test sistemi olan *Drosophila* SMART, 1984 yılında Graf ve arkadaşları tarafından geliştirilerek çeşitli kimyasallar, insektisitler, UV ve radyoaktif ışınlar gibi genotoksik ajanların ökaryotik hücrelerdeki mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin belirlenebilmesi sağlanmıştır. Ayrıca yine bu test yöntemi kullanılarak çeşitli antigenotoksik ajanların aktivitesi de ölçülebilmektedir.

3.1.4. *Drosophila melanogaster*'in sistematigi

Üst alem (Superregnum=Domain): Ökaryotlar (Eukarya).

Alem (Regnum): Hayvanlar alemi (Animalia).

Şube (Phylum): Eklem bacaklılar (Arthropoda). Kitinden yapılmış bir dış iskeletleri vardır ve üyeleri eklemlidir.

Alt şube (Subphylum): Mandibulata-Antennata. Bu alt şubeye dahil olan hayvanlar antenli olup mandibulları iyi gelişmiş ve kuvvetlidir. İç kısmında sert dişler bulunur.

Sınıf (Classis): Böcekler- Altı bacaklılar (Insecta-Hexapoda). Vücut; baş, gövde ve abdomen olmak üzere üç kısma ayrılır. Başta bir çift anten ve bir çift bileşik göz bulunur. Toraks bölgesinin üç segmentli olması ve her göğüs segmentinde bir çift bacağın bulunması ile tanınırlar. İkinci (mesotoraks) ve üçüncü (metatoraks) göğüs segmentlerinden birer çift kanat çıkar. Abdomen 11 segmentten oluşur. Bu segmentler üye taşımaz.

Alt sınıf (Subclassis): Kanatlı böcekler (Pterygota). Mesotoraks ve metatoraksta hareketli kanatlar taşırlar.

Üst takım (Superordo): Uzun kanatlılar (Mecopteroidea-Panorpoidea). Arka kanatları körelme eğilimi gösterir.

Takım (Ordo): İki kanatlılar (Diptera). Göğüs bölgesinden bir çift kanat çıkar. Metatorakstaki ikinci çift kanatlar halter adı verilen topuz şeklinde bir denge organına dönüşmüştür (Şekil 3.1).

Alt takım (Subordo): Sinekler-Kısa antenliler (Brachycera). Larvada ağız çengelleri bulunur. Pupa, üçüncü larva evresinden kalma bir deri ile sarılır. Antenleri çok kısadır ve birbirinden farklı şekilleri olan segmentlerin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Üçüncü anten segmenti ya sadece uç kılı taşır (arista) ya da bu segmenti izleyen anten segmentleri birbiriyle kaynaşarak kamçı oluşturur.

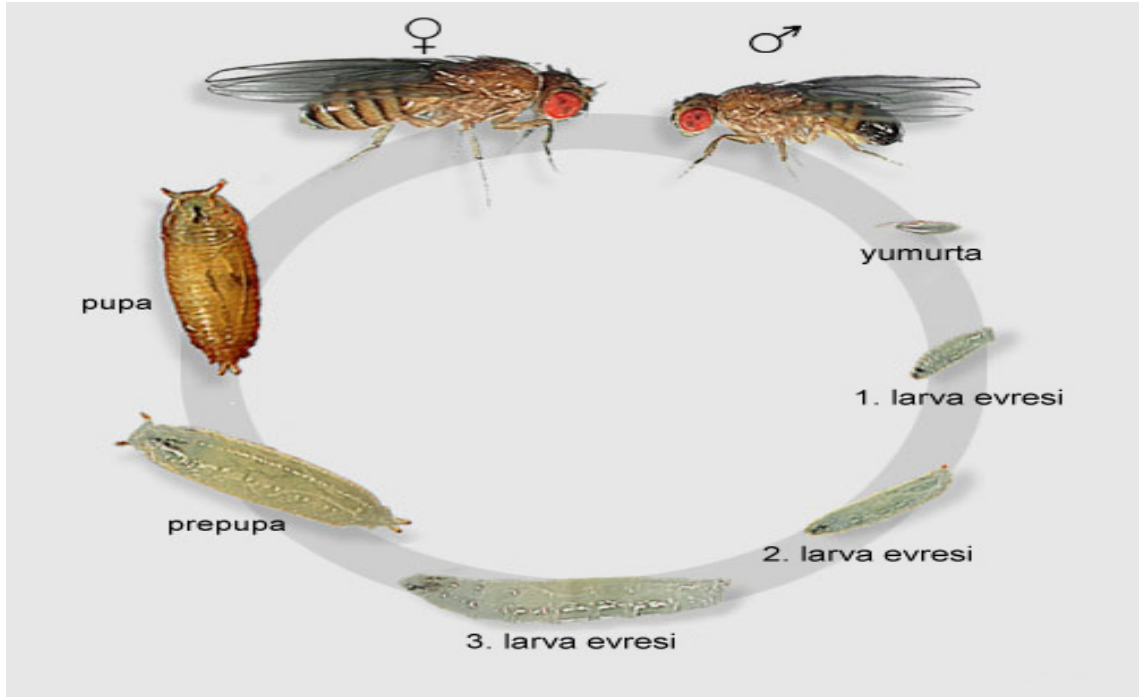
Familiya (Familia): Sirke sinekleri-Meyve sinekleri (Drosophilidae). Çürümekte olan meyvelerin ve bazı tatlı sıvıların (meyve suyu, şarap, sirke, bira v.s) kokusuna pozitif kemotaksi gösterirler. Ayrıca, bitki öz suları, dışkılar ve mantarlar içinde de gelişebilirler.

Cins (Genus): *Drosophila*. Oldukça küçüktürler. Ev sineğinin 1/3'ü kadardırlar. 750 türü bilinmektedir.

Tür (Species): *Drosophila melanogaster*

3.1.5. *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü

D. melanogaster'de gelişim tam başkalaşım (holometabol) şeklindedir. Ergin olmadan önce *D. melanogaster* embriyosu sırasıyla üç larva, prepupa ve pupa evrelerini geçirir. Döllenmeden yaklaşık 22-24 saat sonra yumurtadan larva (1. larva evresi) çıkar. İki deri değişiminden sonra (2. ve 3. larva evreleri) yaklaşık 5. günde prepupa daha sonra pupa meydana gelir (Şekil 3.2). Yumurtadan ergin bireyin oluşması için geçen süre, yaklaşık 9-10 gündür. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü ve ömür uzunluğu sıcaklık (Sorensen and Loeschcke 2002; Sinclair and Roberts 2005; Ayar *et al.* 2009, 2012), beslenme (David *et al.* 1975; Fred and Timothy 1997; Aşkın *et al.* 2007), popülasyon yoğunluğu, çiftleşme, nem, radyasyon, toksik ajan (Clark and Rockstein 1964; Ünlü and Bozcuk 1979; Kızılet ve Uysal 2012) gibi faktörler tarafından farklı şekilde etkilenmektedir.



Şekil 3.2. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü (Anonymous 2012)

3.1.6. SMART’da kullanılan *Drosophila* mutant ırklarının genetik yapısı

Çalışmamızda, *D. melanogaster*’in normal metabolik aktiviteye sahip multiple wing hair (*mwh*) (Şekil 3.3) ve flare (*flr³*) (Şekil 3.4) mutant soyları kullanılmıştır. Bu hatlar Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden temin edilerek bölümümüz Genetik Araştırma Laboratuvarı’nda standart Lewis besin ortamında (Lewis and Bacher 1968) (Çizelge 3.2) $25\pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 bağıl nemde kültüre alınmıştır. Bu ırkların genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley and Zimm 1992).



Şekil 3.3. Multiple wing hair (*mwh*)
mwh/mwh



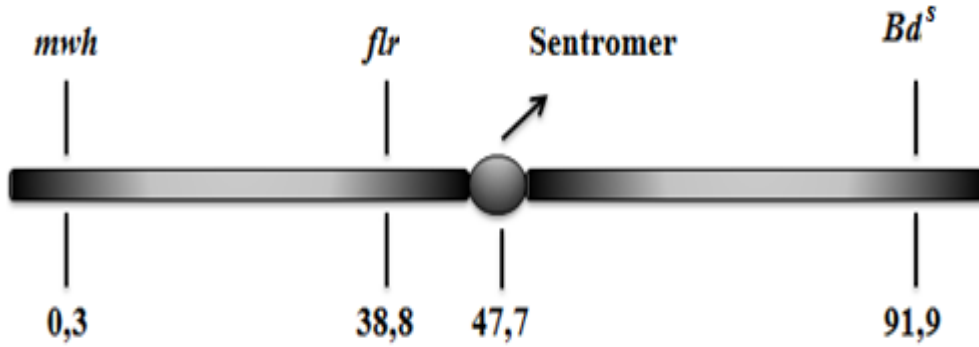
Şekil 3.4. Flare (*flr³/In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s*).
Bu soy genotipik olarak kısaca *flr³/TM3, Bd^s* şeklinde de gösterilmektedir.

Belirleyici (marker) genlerden çoklu kanat kılı (multiple wing hair) geni üçüncü kromozomun telomere yakın bölümünde bulunur (3-0,3). Bu gen resesiftir ve homozigot durumda (*mwh/mwh*), hücre başına bir kanat trikomu (kılı) yerine çoklu kanat trikomlarının oluşumuna yani aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda kanat trikomunun çıkmasına neden olmaktadır (Graf *et al.* 1998).

Diğer belirleyici gen olan *flare* (*flr³*) geni, yine üçüncü kromozom kolunda, fakat sentromere daha yakın (3-38,8) olarak yer alır. Bu gen, sineklerin kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine farklı kıl tiplerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bunlar; körelmiş, koyu renkli balon şeklinde kıllar veya kısalmış ve koyulaşmış olan amorfik şekilde meydana gelen kıl tipleridir (Graf *et al.* 1984).

Flare geni homozigot durumda embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Letalite sebebiyle de ergin bireyler oluşamamaktadır. *Flare* genine ait bilinen üç mutant allelin hepsi homozigot durumda letalite gösterir. Fakat heterozigot bir bireyin kanat imajinal disklerinden mutant kanat hücreleri gelişir. Bu nedenle hem bireyleri *flare* geninin embriyonik letal etkisinden korumak hem de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici bir kromozom olan TM3 kromozomu (*flr³/TM3, Bd^s*) kullanılmaktadır (Graf *et al.* 1998).

Dominant bir gen olan *Bd^s* (beaded-serrat) geni de belirleyici genlerden birisidir ve homozigot halde iken letal etki gösterir. Normal bireylerde kanatlar düzgün kenarlı iken, *Bd^s* genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklindedir (Şekil 3.4) (Graf and Würzler 1996). *Bd^s* geni, dengeleyici kromozom (TM3) üzerinde bulunmaktadır. Dengeleyici kromozom, letal etkisinden kurtulmak istenilen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde yer almaktadır. Bu kromozom sayesinde, embriyonik evrede homozigot durumda letal etki gösteren genler baskılanmaktadır (Lindsley and Zimm 1992). *mwh*, *flr* ve *Bd^s* belirleyici genleri, *Drosophila*'nın üçüncü kromozomu üzerinde bulunmaktadır ve bu genlerin dizilişi Şekil 3.5'de görülmektedir (Graf *et al.* 1984).



Şekil 3.5. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri

3.1.7. *In vitro* KKD ve MN için donör seçimi ve kan örneklerinin alınması

Çalışmanın ikinci bölümünde *in vitro* test tekniklerinden insan periferik lenfosit hücrelerinde yapılan KKD testi ve MN testi kullanılmıştır. *In vitro* olarak yapılan çalışmaların tümünde sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon hastalığı geçirmemiş, X ışını gibi herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 23-25 yaşlarında sağlıklı 4 farklı donörlerden alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1.8. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin toplanması

Deneyleerde antijenotoksik ajan olarak kullanılmak üzere belirlenen semizotu bitkisi (Şekil 3.6), Adıyaman ili merkez ilçesine bağlı Hasancık köyü civarında, 600-900 metre yükseklikte toplanmıştır. Doğal ortamında, çiçeklenme döneminde ve tarıma uzak arazilerden toplanan örnekler, Doç. Dr. Meryem Şengül Köseoğlu (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. Toplanan semizotu bitkilerinin toprak üstü organlarının tamamı (gövde, yaprak, çiçek) güneş görmeyen gölge ortamda, oda sıcaklığında (22–24°C), her gün kurutma kâğıtları değiştirilerek ve çürüyenler ayıklanarak kurutulmuştur. Tüm toprak üstü organları kurutulan bitkiler öğütülerek granüle hale getirilmiştir.



Şekil 3.6. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisine ait çeşitli görüntüler

3.1.9. Semizotu metanol (PO_{met}) ekstraktının hazırlanması

50 g tartılan öğütülmüş semizotu kuru 150 mL metanol ile ekstrakte edilmiştir. 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, metanol ve bitki karışımı süzgeç kâğıdından geçirilmiştir. Bu işlem üç defa tekrarlanarak çözelti miktarı artırılmıştır. Birleştirilen süzüntüler, 50 °C sıcaklıkta soxhlet ekstraktörü ile yoğunlaştırılmıştır. (Şekil 3.7) Bu ekstraksiyon sonucunda 3,2 gram ekstre elde edilmiştir. Aynı işlem 50 g semizotu ile tekrar yapılmıştır. İkinci ekstraksiyon işleminde 3,6 g ekstre elde edilmiştir. Toplamda 6,8 g semizotu metanol ekstraktı (PO_{met}) elde edilmiştir. PO_{met} deneylerde %1'lik DMSO'da çözümlenerek uygulanmıştır.



Şekil 3.7. Semizotu metanol ekstraktının hazırlanma düzeneği

3.1.10. Semizotu su (PO_{su}) ekstraktının hazırlanması

100 g tartılan öğütülmüş semizotu kuru üzerine 60-80°C sıcaklıkta 300 mL saf su dökülüp oda sıcaklığına (22-24°C) gelinceye kadar bekletilmiştir. Soğuyan karışım

süzgeç kâğıdından geçirilerek sulu bitki çözeltisi elde edilmiştir. Çözelti -18°C 'de dondurulmuştur. Dondurulmuş çözeltideki su, liyofilizatör cihazı yardımıyla uzaklaştırılmış ve su ekstraktı elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt -18°C 'de saklanmıştır. Semizotu su ekstraktı (PO_{su}) deneylerde kullanılacağı zaman distile suda çözülerek uygulanmıştır.

3.1.11. Genotoksisite testlerinde kullanılan çözeltiler ve tamponlar

- **Etil metansülfonat (EMS) çözeltisi**

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan EMS %50'lik etil alkolde hazırlanmış ve kültür tüplerine son konsantrasyonu 1 ppm - 10 mM olacak şekilde ilave edilmiştir.

- **5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) çözeltisi**

30,7 mg toz BrdU 10 mL distile suda çözülerek stok BrdU hazırlanmıştır (10^{-2} M). Stok çözelti ışık görmeyen tüpde, -20°C 'de saklanmıştır.

- **Hipotonik çözelti**

0,5592 gr KCl tartılarak 100 mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0,075 M olan KCl çözeltisi, kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak etüvde 37°C 'ye kadar ısıtılmıştır.

- **Tespit (fiksatif) çözeltisi**

1 ölçek glasiyal asetik asitin üzerine 3 ölçek metanol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlanmıştır. Kullanılmadan iki saat önce hazırlanıp buzdolabında (-20°C 'de) soğutulmuştur.

- **Hoechst (Bisbenzimid) fluoresan boya çözeltisi**

Stok Hoechst 33258 boyası, distile su ile son konsantrasyonu 2,5 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok şişesi ışık görmemesi için siyah bantla kaplanarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

- **Fosfat tamponu (PBS) (PH:7)**

8gr NaCl, 0,2gr KCl, 0,2gr KH_2PO_4 ve 2,32gr Na_2HPO_4 alınmış ve 1 litre distile suda çözülmüştür. Çözelti kullanımdan iki saat önce taze hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Mac II vaine tamponu**

Mac II vaine tamponu 2 tampondan oluşmaktadır:

Tampon A : 0,1 M anhidroz $C_6H_8O_7$ (sitrik asit) solüsyonu (19,2 gr/L)

Tampon B : 0,2 M anhidroz Na_2HPO_4 solüsyonu (28,4 gr/L)

Tampon A'dan 8 mL, tampon B'den 92 mL alınmış, PH'sı sitrik asit ile 7,1'e ayarlanmıştır. Çözelti kullanımdan iki saat önce taze hazırlanarak +4°C'de saklanmıştır.

- **2xSSC çözeltisi**

1,74 gr NaCl, 100 mL distile suda çözülmüştür. Ayrıca 0,882 gr $C_6H_5Na_3O_7$ (sodyum sitrat) 100 mL distile suda çözülmüştür. Her iki solüsyondan eşit hacimlerde alınarak karıştırılmıştır. Solüsyonun PH'sı sitrik asitle 7,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözelti kullanımdan iki saat önce taze hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Söranson tamponu**

A solüsyonu: 4,537 gr KH_2PO_4 500 mL distile suda çözülmüştür.

B solüsyonu: 5,935 gr Na_2HPO_4 500 mL distile suda çözülmüştür.

A solüsyonundan bir miktar alınmış, PH 6,8'e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırılmıştır.

- **Giemsa boya çözeltisi**

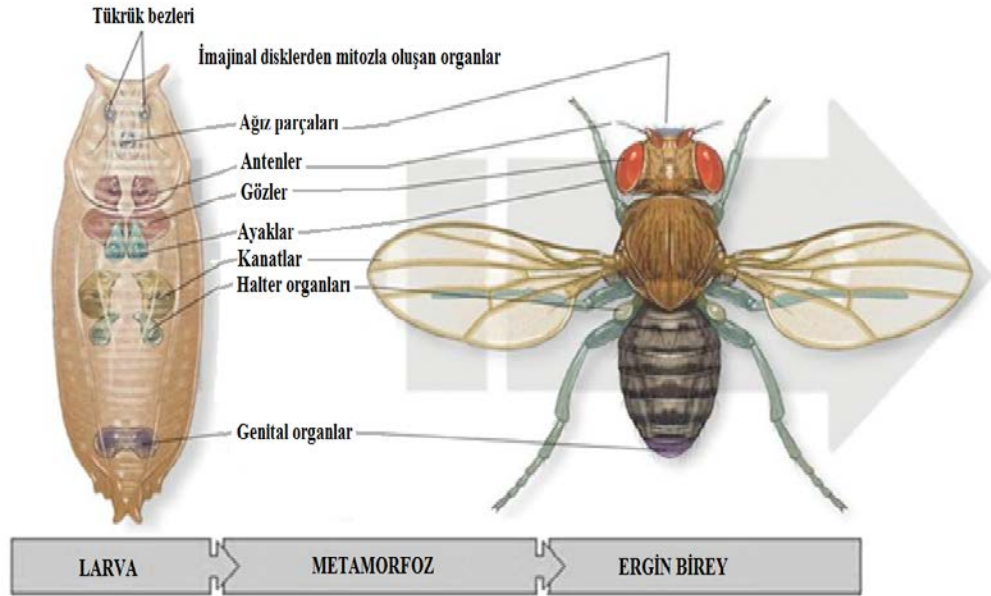
5 mL giemsa boyası 95 mL PH 6,8'lik söranson tamponu içine ilave edilerek 100 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım üzerinde biriken köpük ve yağ kurutma kağıdı ile alınmıştır. Boya çözeltisi kullanımdan iki saat önce taze hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.1.12. *In vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

In vivo test sistemleri içerisinde model organizma olarak *Drosophila*'nın kullanıldığı somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) son yıllarda sıkça kullanılan testlerden birisidir. Nokta mutasyon, delesyon, kromozom bozukluğu ve mitotik rekombinasyonun tespit edilmesine olanak sağlayan SMART, üreme hücrelerindeki mutasyonları belirlemek için kullanılan test sistemlerinden daha avantajlıdır (Graf and Würzler 1996). Diğer testlerle karşılaştırıldığında, kimyasal maddelerin somatik

hücrelerde oluşturduğu mutasyon, genetik işaretlerle kolaylıkla ölçülebilir ve daha doğru sonuçlar verir. Bu yüzden daha hızlı, güvenilir ve ekonomiktir.

SMART, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki teknikte de embriyonik gelişim dönemindeki larvanın, imajinal disk adı verilen büyük hücre grupları hedef alınır. İmajinal diskler, larval gelişim sırasında mitozla çoğalır ve metamorfoz ile ergin bireyin kanat, göz, bacak gibi farklı vücut yapılarını oluşturur (Şekil 3.8).

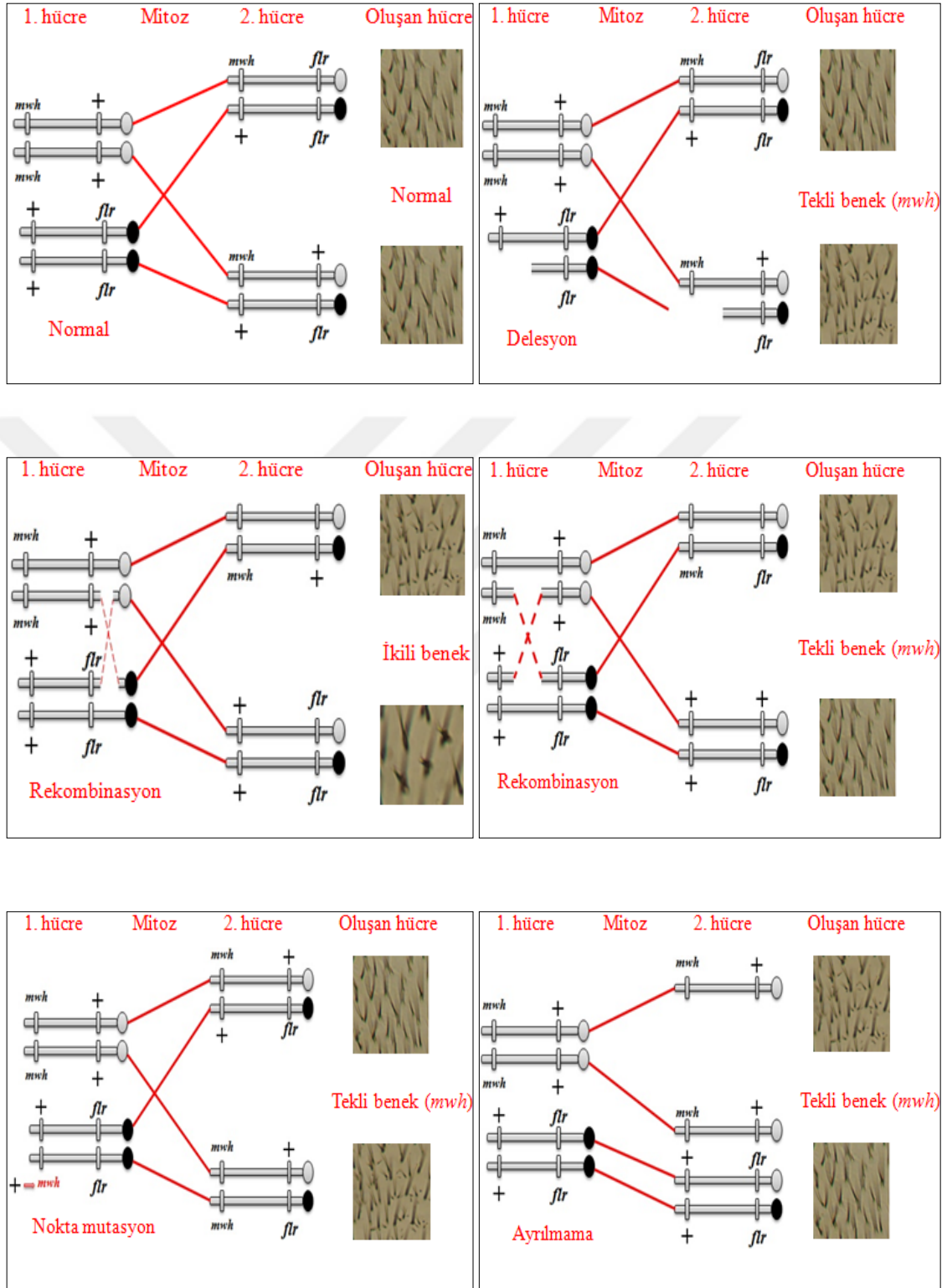


Şekil 3.8. *D. melanogaster*'de larval döneme ait imajinal diskler ve ergin bireyde oluşturdukları vücut kısımları (Anonymous 2013)

İmajinal disk hücrelerinin herhangi birinde oluşan genetik değişiklik, imajinal disklerden mitozla çoğalan hücelere de aktarılarak mutant hücre grupları (klonlar) oluşur. Bu genetik değişiklik fenotipte gözlenebilen bir değişikliğe neden olarak ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde mutant klonları ortaya çıkarır. Böylece, heterozigotluğun herhangi bir mutasyonla kaybedilmesi yabancı fenotipin kaybedilip, mutant fenotipin ortaya çıkmasına neden olur. Kimyasal maddelere maruz bırakılan sineklerde indüklenmiş klonların toplam sayısı, uygulanan kimyasalın toplam

genotoksik aktivitesi ile ilgili sayısal sonuçlar verirken, klonların tipi ise klon oluşumunda rol oynayan mutasyonel mekanizmaları ortaya çıkarır (Graf *et al.* 1984; Guzman-Rincon and Graf 1995).

Mutant fenotip, farklı mutant hücre klonları ile belirlenmektedir. *mwh* veya *flr³* fenotipi taşıyanlar tek tip klon olarak adlandırılırken, *mwh* ve *flr³* fenotipini beraber taşıyan klonlar ikiz klon olarak adlandırılır. Tek tip ve ikiz klon oluşumları farklı genetik mekanizmalara bağlıdır (Şekil 3.9). Delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve iki işaret geni olan *mwh* ve *flr³* arasındaki mitotik rekombinasyon tek tip klonların oluşumunu tetiklerken; mitotik rekombinasyon hem tek tip klon hemde ikiz klonların oluşumuna sebep olmaktadır. İkiz klonlar ise 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Kaya *et al.* 2004). Serrat kanada (*mwh/TM3*) sahip bireylerde *TM3* kromozomunun baskılanmasından dolayı mitotik crossing over gerçekleşmemektedir (Frei and Würzler 1996).



Şekil 3.9. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi

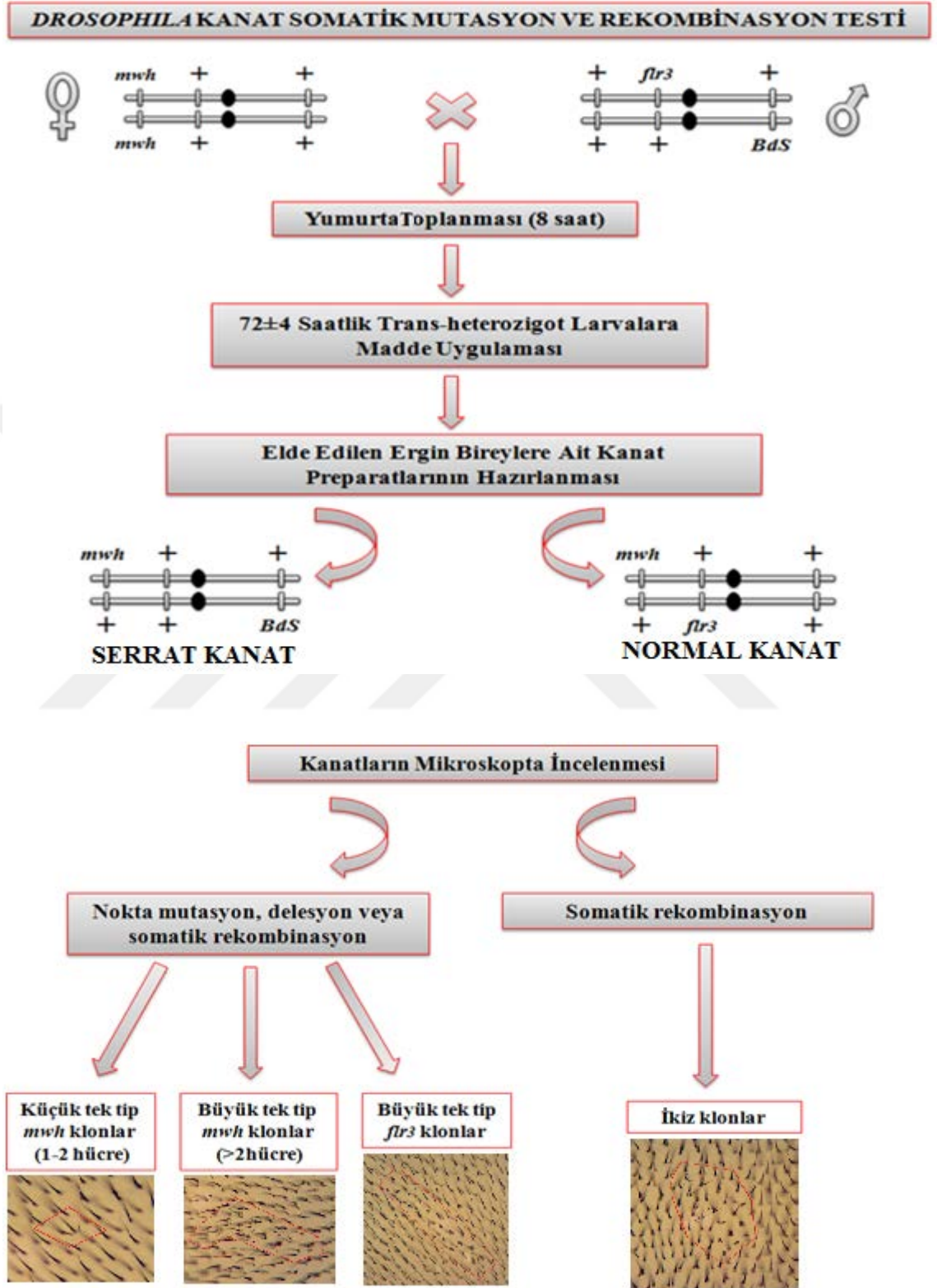
Bu çalışmada, *in vivo* test tekniği olarak *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ya da diğer adıyla kanat benek testi kullanılmıştır. Testin uygulanması için, ebeveyn olarak flare erkek ve *mwh* dişi bireyler seçilmiştir. Bu çaprazlamanın genotipik gösterimi aşağıdaki gibidir;

P: ♀♀ *mwh / mwh* X ♂♂ *flr³ / TM3, Bd^s*

P_G: *mwh ; mwh* *flr³ ; TM3, Bd^s*

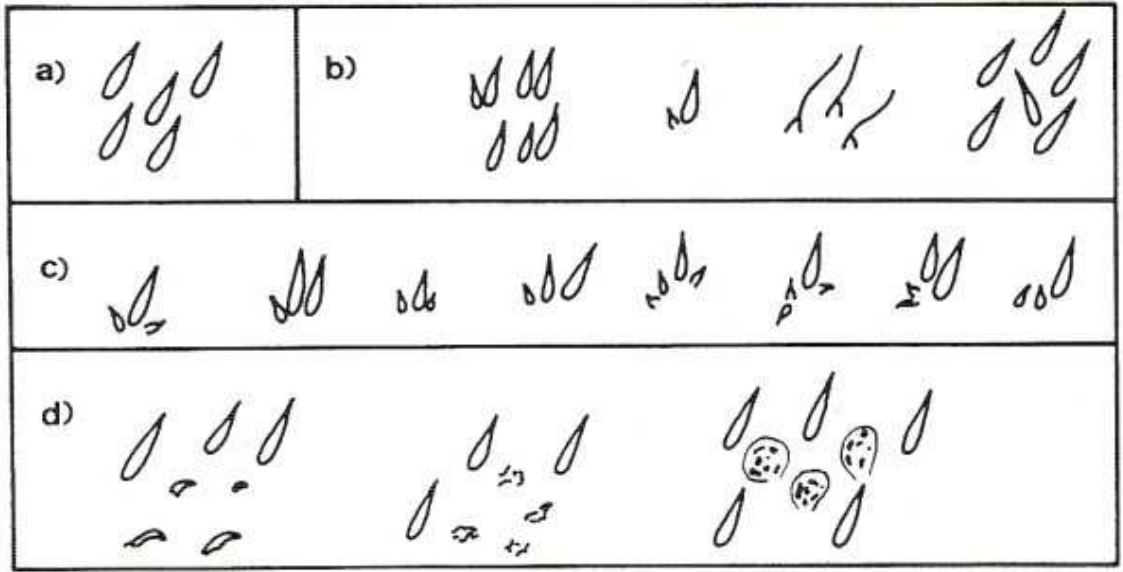
F1: *mwh / flr³* (Normal kanatlı) ; *mwh / TM3* (Serrat kanatlı)

Ebeveyn olarak seçilen bireyler arasında yapılan çaprazlamalar ile elde edilen 72 saatlik trans-heterozigot larvalara farklı konsantrasyonlarda insektisit ve insektisit+bitki ekstraktları uygulanmıştır. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için trans-heterozigot larvaların elde edilmesi ve bu larvalara farklı insektisit ve bitki ekstraktları uygulanması Şekil 3.10'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.10. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin uygulama şekli ve sonuçlarının şematik gösterimi

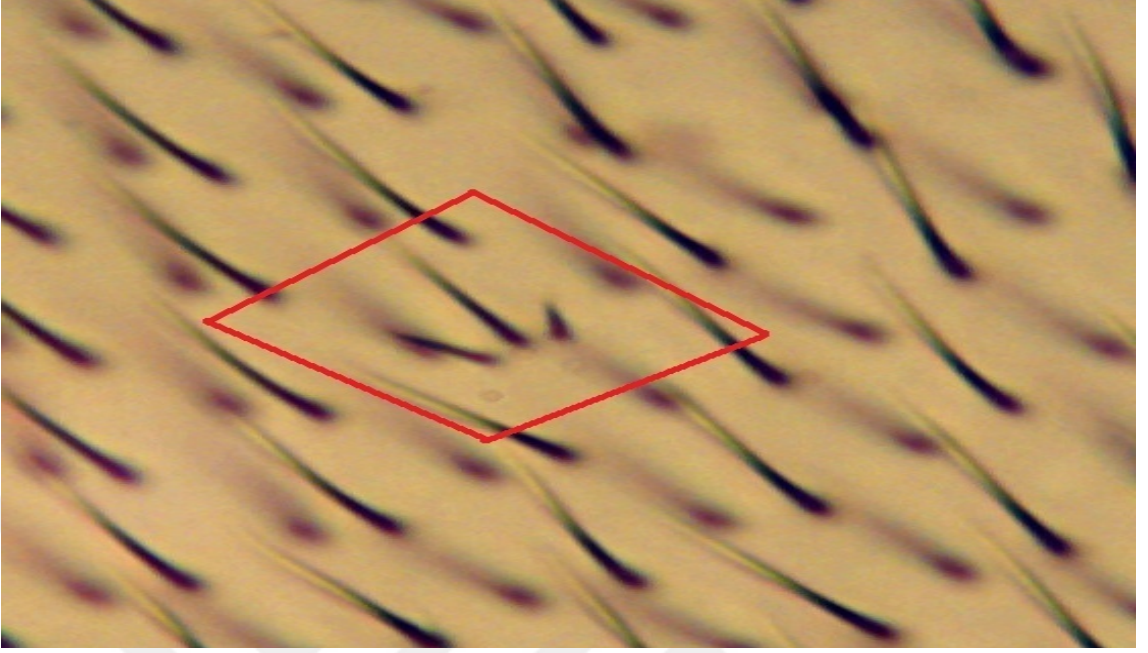
Kanat kıllarında beklenen somatik mutasyonu belirlemek amacı ile hazırlanan kanat preparatları 10 X 40 büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiş ve kanatların hem dorsal, hem de ventral yüzeyleri ayrı ayrı analiz edilerek *mwh* ve/veya *flr³* mutant fenotipler sayılmış ve kayıtları tutulmuştur. Graf *et al.* (1984)'e göre, kanatlarda görülen farklı tip kanat kılları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



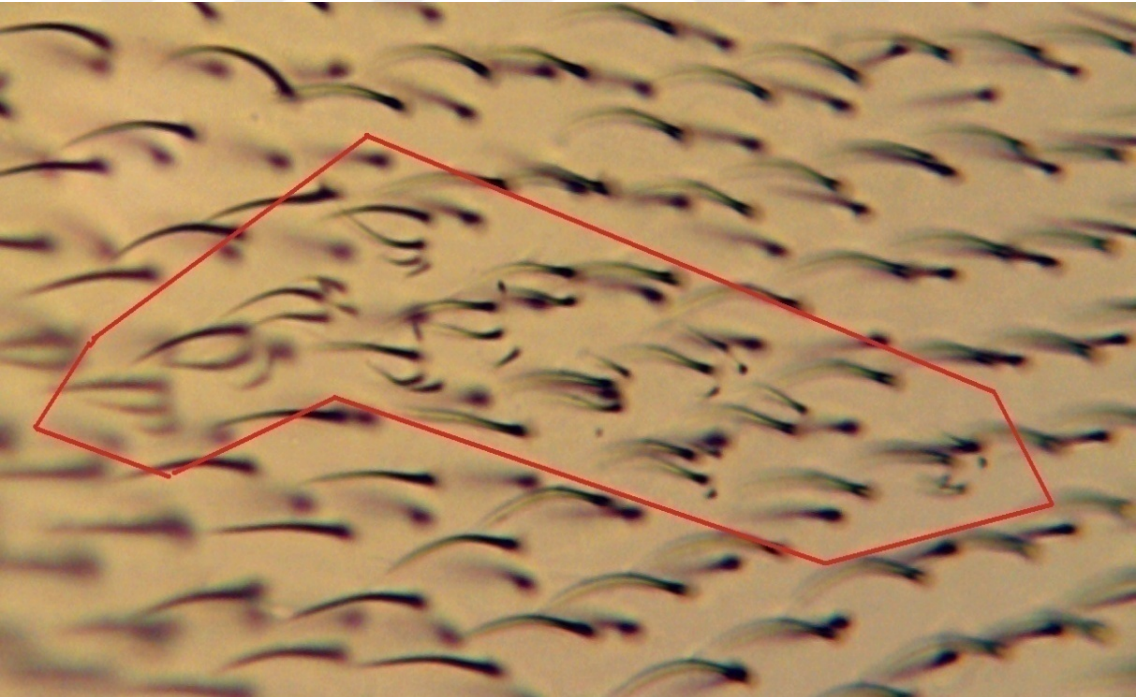
Şekil 3.11. Trans-heterozigot bireylerin kanatlarındaki farklı kıl tipleri

a) Normal, b) *mwh* veya *flr* gen özelliği olarak sayılmayan yapısal bozukluklar c) *mwh* gen özelliğine sahip kıl tipleri d) *flr* gen özelliğine sahip kıl tipleri

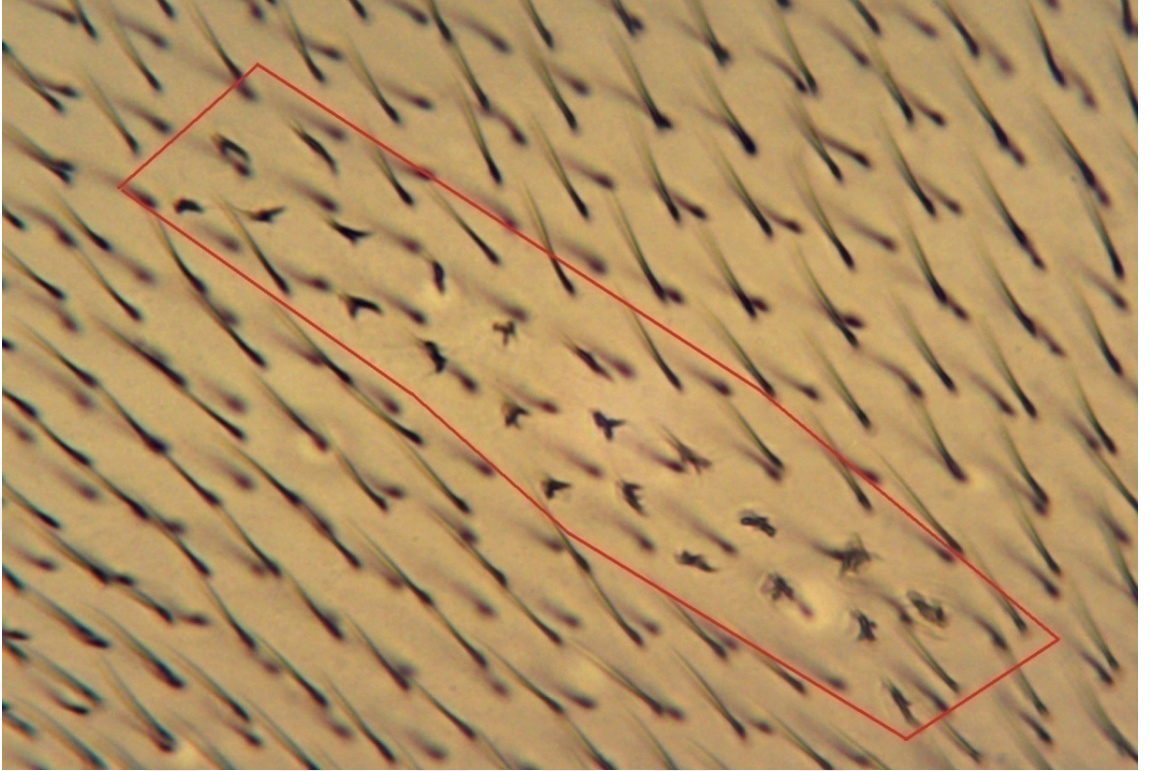
Kanatlardaki mutant klonlar, içerik ve büyüklüklerine göre küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olarak sınıflandırılmaktadır. Tek tip klonlar *mwh* (Şekil 3.12, 3.13) veya *flr³* (Şekil 3.14) fenotipinde iken, ikiz klonlar *mwh* ve *flr³* fenotiplerini (Şekil 3.15) birlikte taşımaktadır.



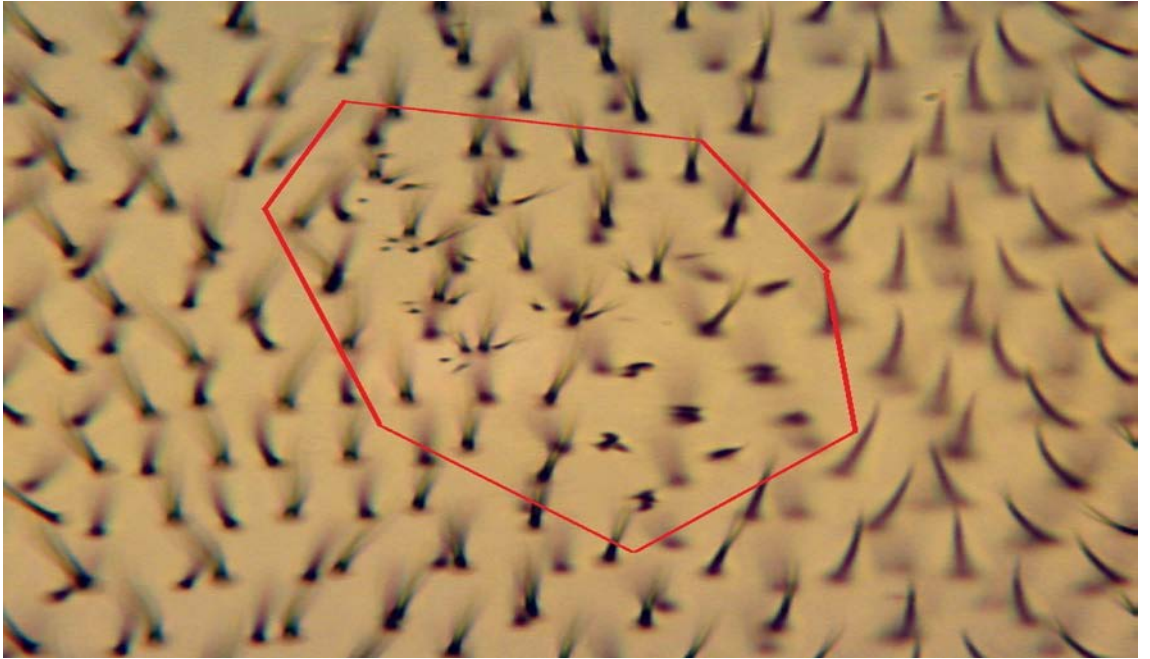
Şekil 3.12. *mwh* fenotipindeki küçük tek tip klon



Şekil 3.13. *mwh* fenotipindeki büyük tek tip klon



Şekil 3.14. flr^3 fenotipindeki büyük tek tip klon



Şekil 3.15. mwh ve flr^3 fenotiplerini beraber taşıyan ikiz klon

Tek tip klonlar küçük ve büyük olarak ayrı ayrı sınıflandırılmaktadır. Küçük tek tip klonlar yalnızca *mwh* hücrelerden oluşmaktadır. Çünkü, klon başına 4 hücreden az sayıda oluşan *flr³* fenotipi, *flr* allelinin baskılanmamasının sonucunda oluşmakta ve göz ardı edilmektedir (Szabad *et al.* 1983). Büyük tek tip klonlar ise 3 ve daha fazla sayıdaki *mwh* veya 4 ve daha fazla sayıdaki *flr³* mutant hücrelerinin oluşturduğu klonlardır. İkiz klonlar ise *mwh* ve *flr³* fenotiplerinin aynı klonda birlikte bulunmasıyla oluşmaktadır. Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıdaki inversiyonlar nedeni ile rekombinasyonlar engellenmiştir (Schaik and Graf 1991). Dolayısıyla serrat kanatlı bireylerde *flr³* mutant hücreleri gözlenemez. Ayrıca, somatik hücrelerde genetik değişikliğin indüksiyon zamanı ve mutant klonların büyüklüğü arasında pozitif bir ilişkinin olduğu da belirtilmektedir. Guzman-Rincon and Graf (1995)'a göre, eğer mutasyon hücre bölünmesinin yoğun olduğu erken dönemde olursa, bu mutant hücreden köken alan hücrelerin sayısı daha fazla olacak ve daha büyük klonlar içerecektir.

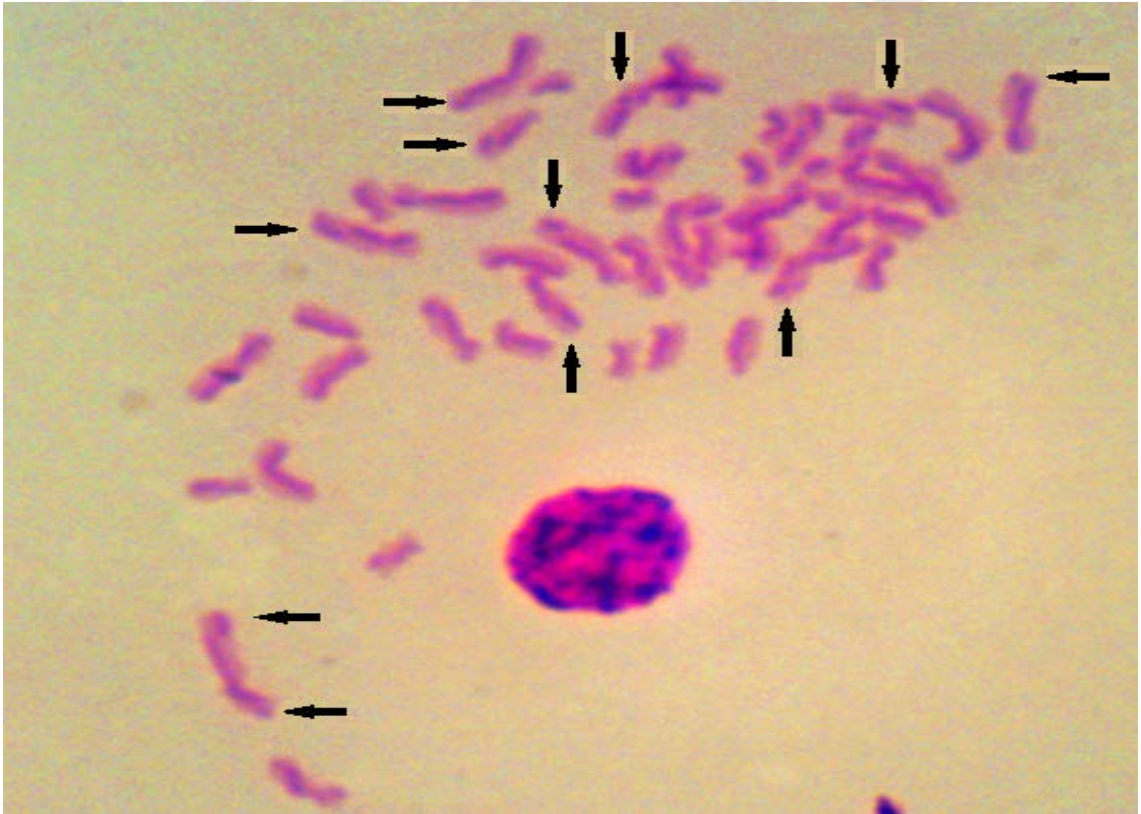
3.1.13. *In vitro* kardeş kromatid değişim testi (KKD)

In vitro mutajenik çalışmalar içinde yaygın olarak kullanılan sitogenetik test tekniklerinden birisi kardeş kromatid değişimi (KKD) testidir. KKD, kromozom morfolojisinde bir değişim olmadan, bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır (Latt *et al.* 1981).

Latt tarafından 1973'te uygulanan yöntemde, timidin analogu olan BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin) iki replikasyon döngüsünde bulunacak şekilde kültür ortamına eklenmiştir. BrdU varlığında devam eden DNA replikasyonu ile yeni oluşan DNA'da timin yerine BrdU girer. Böylece her bir kromatid, bir timinli ve bir de BrdU'lu DNA zinciri içerir. Mitoz sonrasında her bir kromatid farklı bir kardeş hücreye gider. BrdU'nun hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, floresan-giemsas tekniği ile farklı boyanarak kardeş kromatidlerdeki kırıklar görünür hale gelir (Natarajan 2002). Yapılan incelemede, bir kromatid iki tane BrdU içeren DNA zinciri taşıdığı için açık renk, diğeri bir timinli bir de BrdU'lu DNA zinciri

taşıdığı için koyu renkli gözlenir (Perry and Wolff 1974). Bu şekilde kardeş kromatidlerdeki değişimler belirlenmektedir (Şekil 3.16).

Türkez (2007)'nin bildirdiğine göre, KKD oluşumu üzerinde etkili olabilen pek çok faktör mevcuttur. Bunlar, kültürlere eklenen BrdU miktarı (Rodriquez-Reyes and Morales 2003) ve antikoagülant türü (Tucker *et al.* 1993), inkübasyon sıcaklığı (Carrona and Natarajan 1988), ortamın PH'sı (Tanrıverdi 1991) gibi kültür faktörleri, viral enfeksiyonlar (Kurvink *et al.* 1978), sigara-alkol kullanımı (Lazutka *et al.* 1992; Tang *et al.* 1999), yaş (Ganguly 1995), cinsiyet (Anderson *et al.* 1986) ve kalıtsal hastalıklar (Aledo *et al.* 1989; Sönmez 1992) gibi biyolojik faktörler olmak üzere başlıca iki grup altında toplanabilirler. Ayrıca ilaç kullanımı (Tatar *et al.* 2009), beslenme şekli, fiziksel (UV ve X ışınları) veya kimyasal ajanlara (pestisitler, insektisitler ve petrol ürünleri) maruziyet gibi faktörlerin de KKD frekansını etkileyebildiği belirtilmiştir (Kelsey *et al.* 1990; Baysal *et al.* 2003).

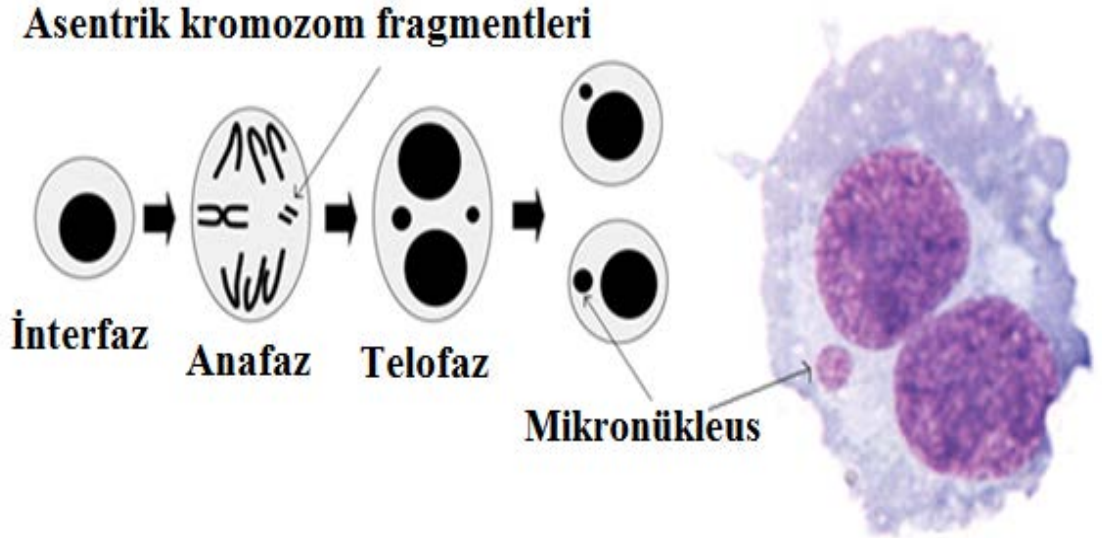


Şekil 3.16. Kardeş kromatid değişimleri

3.1.14. *In vitro* mikronükleus testi (MN)

Mikronükleus tekniği; çeşitli kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik (DNA'da yapısal hasar meydana gelmesi) ve anöjenik (DNA'da sayısal hasar meydana gelmesi) aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir test tekniğidir (Kirsch-Volders *et al.* 1997; Cicchetti *et al.* 1999). Fenech (2000)'e göre mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında anafazda geç kalan kromozom materyalinden veya iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen kromozomlardan meydana gelmektedir. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül etmekte ve böylece ana nükleustan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşmaktadır (Şekil 3.17).

Mikronükleus test sistemi, memelilerdeki test sistemleri arasında en ekonomik ve en kısa süreli yöntem olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Emecen ve Ünlü 1995).



Şekil 3.17. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi (Fenech 1993)

3.2. Yöntem

3.2.1. SMART'da çaprazlama için birey seçimi

Trans-heterozigot larvaların elde edilmesi için *mwh* dişiler 4'er saat aralıklarla virgin iken toplanmış ve yeni bir besin ortamına alınmıştır. Yeterince virgin dişi birey toplandıktan sonra uygulamaların yapılacağı trans-heterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* dişi, 40 *flare* erkek olacak şekilde çaprazlamalar yapılmıştır. Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi bireyler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakılmıştır. Uygulama yapılacak olan larvaların aynı evrede olabilmesi için oogenezi gerçekleştirmiş olan bireylerin 8 saatte bir yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanılmıştır.

3.2.2. SMART için insektisitlerin LD₅₀ ve LD₁₀₀ değerlerinin belirlenmesi

SMART için LD₅₀ ve LD₁₀₀ değerinin belirlenmesi amacıyla 72±4 saatlik (3. evre) trans-heterozigot larvalardan gelişen 100 ergin birey, farklı konsantrasyonlarda insektisit içeren hazır *Drosophila* besi yerinde beslenmiş ve 24 saat içinde yaşayabilen/yaşayamayan bireyler kaydedilmiştir. Bu çalışma 4 kez tekrarlanmış ve toplam 400 larva kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, LD₅₀ ve LD₁₀₀ değerleri belirlenmiştir. Bu değerler baz alınarak her insektisit grubu için dört farklı uygulama grubu oluşturulmuştur.

3.2.3. İsektisit çözeltilerinin ve bitki ekstraktlarının hazırlanarak larvalara uygulanması

72±4 saat sonra yumurtadan üçüncü larva evresine erişmiş olan bireyler ince gözenekli süzgeç yardımıyla çeşme suyu altında yıkanıp besiyerinden ayrılmıştır. Her bir insektisit

için uygulama grupları belirlenirken LD₅₀ değeri baz alınarak hazırlanan uygulama gruplarına ait kanat preparatlarında yeterli mutasyon sayısı/frekansına ulaşamamıştır. Bu nedenle LD₁₀₀ değeri baz alınarak insektisitler için dört farklı uygulama grubu oluşturulmuştur. Her insektisit dört farklı konsantrasyonda Standart Drosophila besi yerine (SDB) eklenerek bu işlem gerçekleştirilmiştir. Testin ikinci aşamasında ise semizotu bitkisine ait antigenotoksisitenin belirlenmesi için, insektisitlerin en yüksek uygulama dozuna %1PO_{met} ve %1PO_{su} ayrı ayrı eklenmiştir. İsektisitlerin uygulama grupları ve LD₁₀₀ değerleri Çizelge 3.5’de toplu olarak gösterilmiştir. Taze olarak hazırlanan SDB+insektisit ve SDB+insektisit+bitki ekstraktı gruplarının her birisine 72±4 saatlik trans-heterozigot 200 larva (3. evre) eklenmiş ve onlar erginleşinceye kadar 25±1°C’de etüvde bekletilmiştir.

Çizelge 3.5. İsektisitlerin LD₁₀₀ değerine göre seçilen uygulama grupları

İsektisitler	Uygulama Konsantrasyonları (ppm)	Larval Mortalite Oranı (%)	Erginleşen Bireylerin Oranı (%)
Bifentrin	4*	10	90
	5*	51	49
	6*	62	38
	7*	80	20
	10**	100	0
Permetrin	5*	48	52
	6*	59	41
	7*	71	29
	8*	87	13
	10**	100	0
İmidakloprid	0,5*	1	99
	1*	20	80
	1,5*	45	55
	2*	81	19
	3**	100	0
Asetamiprid	0,5*	6	94
	1*	23	77
	1,5*	51	49
	2*	86	14
	3,2**	100	0

*: İsektisitlerin uygulama grupları için belirlenen konsantrasyonlar.

** : Her insektisit için belirlenen LD₁₀₀ değerleri.

3.2.4. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Uygulama ortamında insektisitlere ve insektisit+bitkisel ekstraktlara maruz bırakılan larvalardan, pupa evresini takiben, çıkan ergin bireyler günlük olarak, eterle bayılarak toplanmış ve kanat preparatlarını hazırlamak için bu bireyler %70'lik etil alkolde +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bireyler kanat morfolojilerine göre normal (trans-heterozigot mwh/flr^3) ve serrat (dengelenmiş-heterozigot $mwh/TM3, Bd^S$) kanat fenotipli olarak iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan normal fenotipe sahip (mwh/flr^3) olan kanatlar, hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın, serrat kanatlar ($mwh/TM3, Bd^S$), dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan *et al.* 1994). Bu nedenle, her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilmiştir.

Kanat preparatları hazırlanırken saat camı üzerine faure solüsyonundan bir iki damla konulmuştur. Distile suya alınarak alkolden arındırılan sinekler, faure solüsyonu damlatılmış saat camına tek tek alınarak, binoküler mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatlar vücuda bağlandığı yerden tutulup kanat üzerindeki kıllara ve kanada zarar verilmeyecek şekilde vücuttan özenle ayrılmıştır. Her bir bireyin iki kanadı da ayrıldıktan sonra kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (96 adet) yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için kapalı petri kabı içerisinde bir gün bekletilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra lamlara birkaç damla entellan damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24x60 mm) ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kalıcı preparatların üzerindeki kalıntılar ksilol ile temizlenmiştir.

3.2.5. Kanat preparatlarının mikroskobik analizi

Temiz bir şekilde hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kanatların incelenmesinde kolaylık olması açısından, sektörler Şekil 3.18'deki gibi A, B, C, C', D, D' ve E olarak gruplandırılmıştır.



Şekil 3.18. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler (10x5)

Kanatların mutant klon taşıyıp taşımadığını incelemek için, hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. Kanat yüzeyindeki her bir sektör ayrı ayrı taranarak *mwh* ve/veya *flr³* mutant klonlar sayılarak kayıtları tutulmuştur. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar aşağıdaki gibidir;

- Küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)
- Büyük tek tip klon (≥ 3 *mwh* veya ≥ 4 *flr³* hücre)
- İkiz klon (*mwh* ve *flr³* hücrelerin ikisini de yan yana içeren klonlar)

Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf *et al.* (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar yalnızca *mwh* hücrelerden oluşmaktadır. Klon başına 4 hücreden az sayıda oluşan *flr³* alleli baskılanmamanın sonucunda oluşmakta ve göz ardı edilmektedir (Szabad *et al.* 1983). Büyük tek tip klonlar ise 3 veya daha fazla *mwh* ya da *flr³* mutant hücrenin oluşturduğu klonlardır. İkiz klonlar, *mwh* ve *flr³* hücreler aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu durumda veya yan yana iki ayrı klon olarak bulunmasıyla oluşmaktadır. Ancak, yan yana bulunan *mwh* ve *flr³* klonların arasındaki yabancı tip trikomların sayısı üçü geçmiyorsa aynı klon içerisinde değerlendirilerek ikiz klon denilmektedir. Teorik olarak

bir klonun boyutu hücre bölünmesindeki genetik değişikliklerin indüksiyonundan sonra oluşan hücre bölünmelerinin sayısını yansıtmaktadır. Bir klondaki bütün hücreler aynı oranda bölünmektedir, böylece klon büyüklüğü direk olarak 2^0 'dan 2^n 'e kadar olan hücre bölünme sayısını (n) yansıtmaktadır. Bu nedenle, somatik hücrelerdeki genetik değişikliğin indüksiyon zamanı ve klonların büyüklüğü arasında pozitif bir ilişki vardır. Eğer mutasyon, hücre bölünmesinin yoğun olduğu erken dönemde meydana gelirse bu mutant hücreden köken alan klonlar daha fazla hücre içerecek ve daha büyük olacaktır (Guzmán-Rincón and Graf 1995). Bu sebepten dolayı larvaların prepupa evresine en yakın olduğu 3. evre (72 ± 4 saatlik) larvalar tercih edilmiştir.

3.2.6. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Kronik uygulamada, her hücrede ve her hücre bölünmesindeki indüksiyon frekansı aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Bu denkleme göre, sadece *mwh* klonları göz önüne aldığımızda, denklemdaki “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını, “N” analiz edilmiş olan kanat sayısını ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Würgler and Vogel (1986) tarafından, bir kanadın her iki yüzeyinde incelenebilecek hücre sayısının 24 400 olduğu bildirilmektedir. Çaprazlamalar sonucunda oluşan trans-heterozigot larvalardan gelişen bireyler, kanat bakımından normal ve serrat kanat olmak üzere, iki farklı fenotipte gözlenmektedir. Serrat kanatlara sahip bireylerde bulunan dengeleyici kromozomun varlığı, bu kromozom parçası üzerine yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan *Serrate* (*Ser*) sayesinde tespit edilebilmektedir. Dengeleyici kromozomun (*TM3*) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar, sadece mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Böylece, serrat kanatlı bireylerden elde edilen verilerle normal kanatlı bireylerden elde edilen verilerin

karşılaştırılmasıyla çalışmada kullanılan ajanın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Vogel 1992; Frei and Würzler 1996).

3.2.7. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi Microsta paket programı ile değerlendirilirken orijinal (null) hipotez (H_0)’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, alternatif hipotez (H_a)’de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılmıştır. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum and Bowman (1970)’in çizelgesinden yararlanılmıştır. Orijinal ve alternatif hipotezlerin hesaplanmasıyla ortaya çıkan sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak gösterilmiştir (Selby and Olsen 1981; Frei and Würzler 1988).

3.2.8. *In vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD) testi için hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması

Periferik kan kültürleri üzerinde uygulamış olduğumuz KKD yönteminde Evans (1976) ve Perry and Thomson (1984)’un metotları modifiye edilerek hücre kültürleri ve preparatlar hazırlanmıştır. Stok kültür şişesinden, deneylerin yapılacağı kültür tüplerine steril şartlarda 5 mL kromozom medyum konulup 37°C’de etüvde bekletilmiştir. Kültür hazırlanırken sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon hastalığı geçirmemiş, X ışını gibi herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 23-25 yaşlarında sağlıklı 2 erkek ve 2 kadın donörlerden 1/10 oranında heparinize periferik kan kullanılmıştır. 37°C’deki kültürlere 0,5 mL heparinize kan ve son konsantrasyonu 10^{-4} M olacak kadar BrdU eklenmiştir. Tüpler iyice karıştırılarak üzerleri ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılıp $37\pm 1^\circ\text{C}$ ’lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kardeş kromatidler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 24. saatte her insektisit %2 DMSO’da çözülerek her uygulama konsantrasyonu için dilüe edilerek, kültür tüplerine

0,25 mL ayrı ayrı eklenmiştir. İnsektisitlerin uygulama konsantrasyonları yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Uygulama konsantrasyonları BİF, PER, İMİ için 50, 100, 250 ve 500 ppm, ASE için ise 25, 50, 100 ve 250 ppm'dir.

Ayrıca negatif kontrol olarak distile su ve %2 DMSO, pozitif kontrol olarak ise 10 mM EMS kullanılmıştır. Tüm insektisitlerin en yüksek uygulama grubuna kendisi kadar (1:1 v/v) PO_{met} ve PO_{su} ayrı ayrı uygulanarak ikinci bir deney düzeneği hazırlanmıştır. Kültür tüplerine eklenen insektisitler, PO_{met}, PO_{su}, distile su, DMSO, EMS ve BrdU, kontaminasyonu önlemek için membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İnkübasyonun başlangıcından 70 saat sonra her tüpe son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak kadar kolşisin eklenmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Tüpler tekrar 37±1°C'de etüve konularak 2 saat daha beklenmiştir.

3.2.9. KKD preparatlarının hazırlanması

72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atılmıştır. Tüplerde kalan ve hücre içeren yaklaşık 0,5 mL pellet üzerine, iki saat önceden hazırlanarak 37°C'lik etüvde bekletilen 5-6 mL hipotonik çözelti yavaş yavaş eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Hipotonik çözelti eklenen tüpler, 37°C'ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1000 rpm'de tekrar 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant aynı şekilde atılmıştır. Yine kalan pelletler üzerine, iki saat önce taze olarak hazırlanmış soğuk tespit çözeltilerinden 7 mL vortekslenerek yavaş yavaş ilave edilmiş ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine alınmış ve sonra süpernatant atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Tüplerdeki kalan sıvı tamamen berraklaşmıştır. Tüplerdeki süpernatant son olarak atılmış ve kalan pellet pastör pipetiyle pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pipetle çekilen pellet, temizlenerek soğuk (-20 °C) tespit çözeltileri içerisinde bekletilen lamlara yaklaşık 20-25 cm yükseklikten 5-6 damla damlatılmıştır. Damlaların birbirinin üzerine gelmeden lama iyice yayılmasına dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan ve üzerine protokol numarası yazılmış preparatlar gün ışığı görmeyecek şekilde, boyanmak üzere 3 gün oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

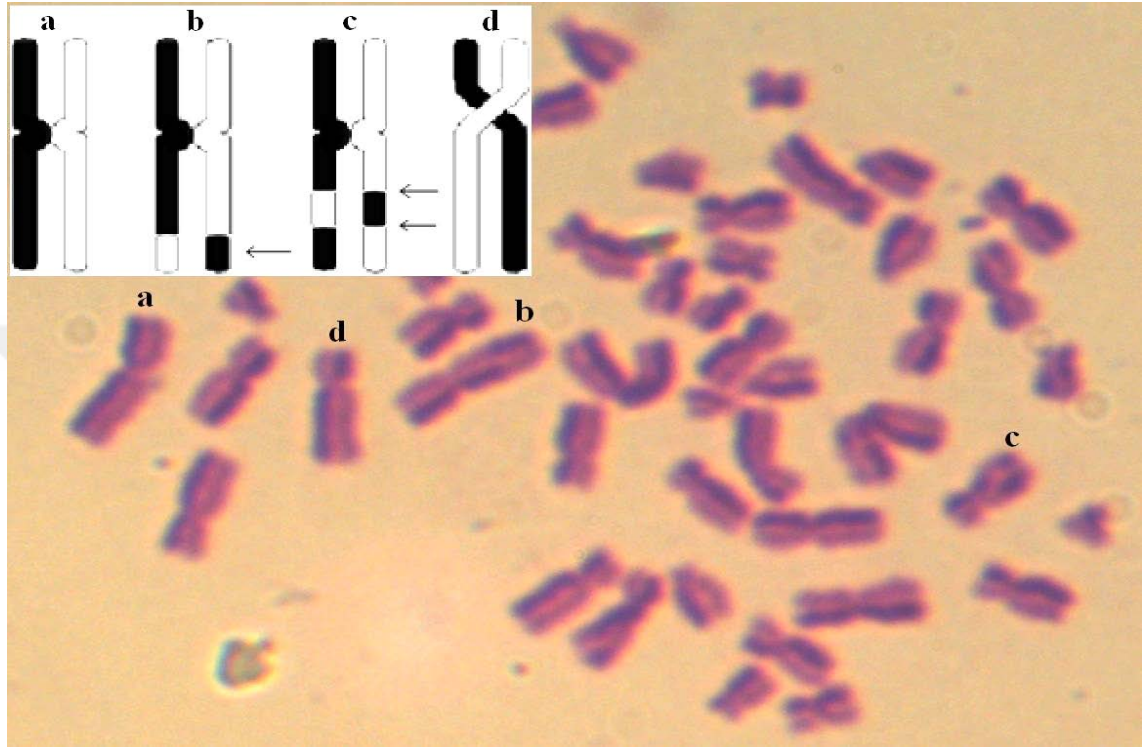
3.2.10. KKD Preparatlarının boyanması ve daimi preparatların hazırlanması

Rooney and Czepulkowski (1986)'nin floresan-giemsas metoduna göre 3. günün sonunda iyice kuruyan preparatlar iki saat önceden taze olarak hazırlanan PBS çözeltisi bulunan şale içerisinde, oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Sürenin sonunda PBS çözeltisi bulunan şale içerisine son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde bisBenzimide (Hoechst 33258) floresan boyası eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Preparatlar bu çözelti içinde 25 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar içlerinde Mac II Vaine tamponu bulunan şalelerde çalkalanarak bir tepsiye dizilmiştir. Üzerlerini örtecek şekilde Mac II Vaine tamponu dökülerek lamellerle kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar ultraviyole lamba altında (366 nm) 60 dk UV ışınına maruz bırakılmıştır. 60 dk sonunda preparatlar üzerindeki lameller alınarak musluk suyu altında yıkanmıştır. Mac II Vaineden temizlenen preparatlar içerisinde 2xSSC çözeltisi bulunan şalelere dizilmiş ve 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 60 dk bekletilmiştir. Preparatlar tekrar çeşme suyu ile yıkanmış ve 13 dk Giemsa boyasında bekletilmiştir. Süre sonunda preparatlar üzerindeki fazla boya musluk suyuyla uzaklaştırılarak oda sıcaklığında ve karanlık ortamda dik şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamaların üzerine entellan kullanılarak lamel kapatılmış ve incelemeye hazır daimi preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.11. KKD Preparatlarının mikroskopik incelemesi

Hazırlanmış olan daimi preparatlar, Boeco marka trinoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100). KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan, ikinci mitozu geçiren, 25 metafaz plağında (4 kişiden toplam 100 metafaz plağı) saptanmıştır. Koyu boyanan kromatidde açık, açık boyanan kromatidde ise koyu renk olarak görünen parçalar KKD değerlerini yansıtmaktadır. KKD sayıları hesaplanırken parça değişimlerinin kromozomların hangi kısımlarından olduğu dikkate alınmıştır. Kromozomların uçlarından bir parça değişimi olmuş ise bu bir KKD,

ortalarından parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak sayılırken, kromatidlerin sentromerden geçiş gösterdiği bölgeler KKD olarak değerlendirilmemiştir (Şekil 3.19).

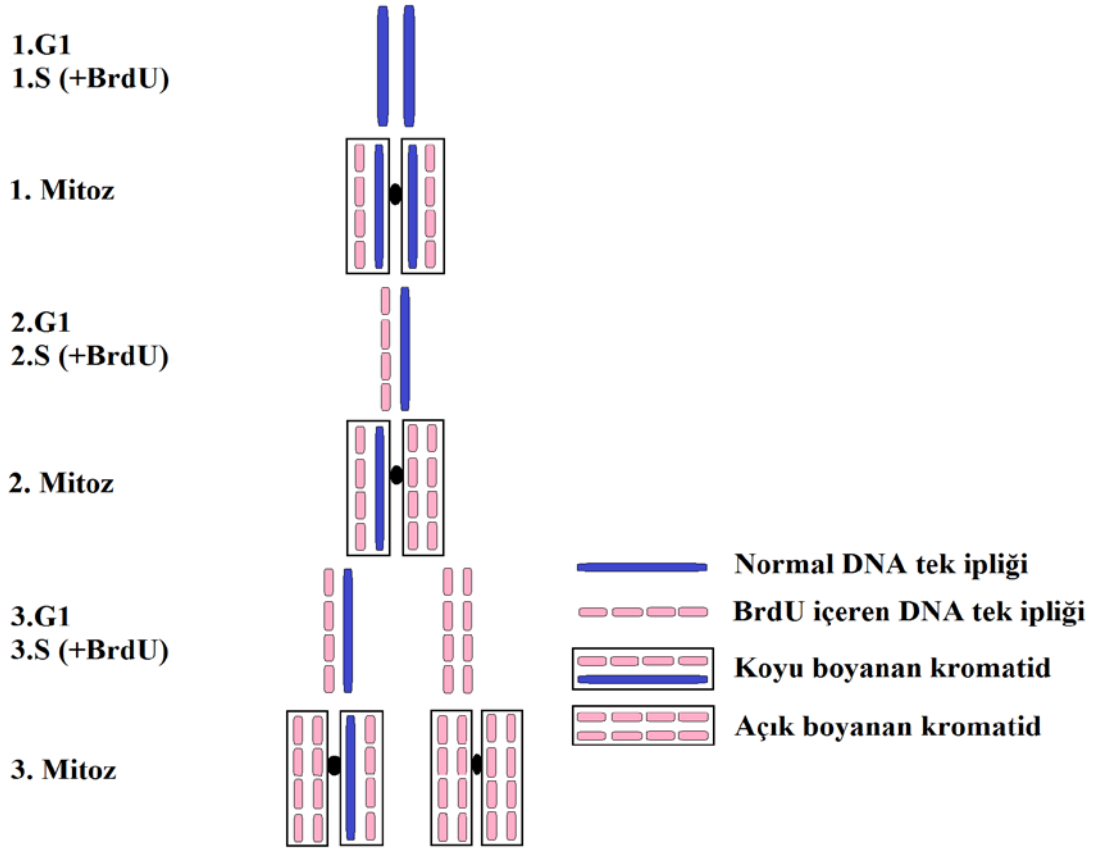


Şekil 3.19. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler
a:KKD yok, b:1 KKD, c:2 KKD, d:KKD yok

Ayrıca insektisitlerin DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile replikasyon indeksi de (Rİ) hesaplanmıştır. Bu hesaplama için rastgele seçilmiş 100 metafaz plağı içerisinde birinci, ikinci ve üçüncü metafaz evresindekiler ayrı ayrı sayılmış ve kaydedilmiştir. Bu evrelere ait şema, Topaktaş ve Speit (1990)'e göre, Şekil 3.20'de verilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak Rİ aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Rİ = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3)/100$$

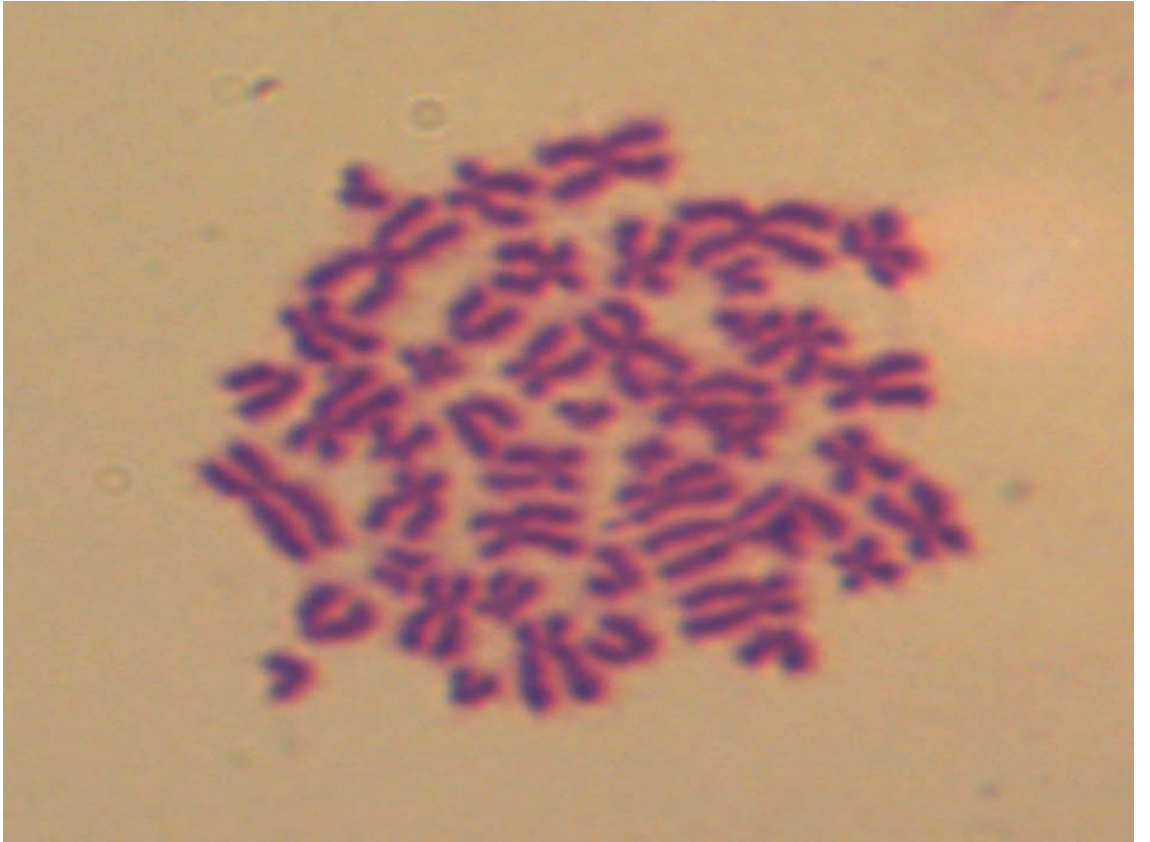
(M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı; M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı; M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı)



Şekil 3.20. DNA'nın semikonservatif replikasyonu sonucu 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin BrdU ile ayırt edilmesinin şematik olarak gösterimi

BrdU, DNA'nın yapısında bulunan timin bazının analogudur ve replikasyon esnasında timinden daha kolay bağlanır. BrdU içeren kültür ortamında hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (BrdU'lu 1. S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU geçecektir. Floresan- giemsa metoduyla boyama yapıldığında, bir kromatidde bulunan 2 DNA zincirinin biri normal diğeri koyu boyanacaktır (semikonservatif). Böyle hücrelerin kromozomları metafaz evresinde boyanarak incelendiğinde kromozomun her iki kromatidi de homojen koyu renkte gözlenecektir. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.21). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde, (BrdU'lu ortamda 2. S fazı) biri BrdU diğeri timin içeren polinükleotid ipliklerine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdU yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği kromozomun koyu boyanan kromatidini ve

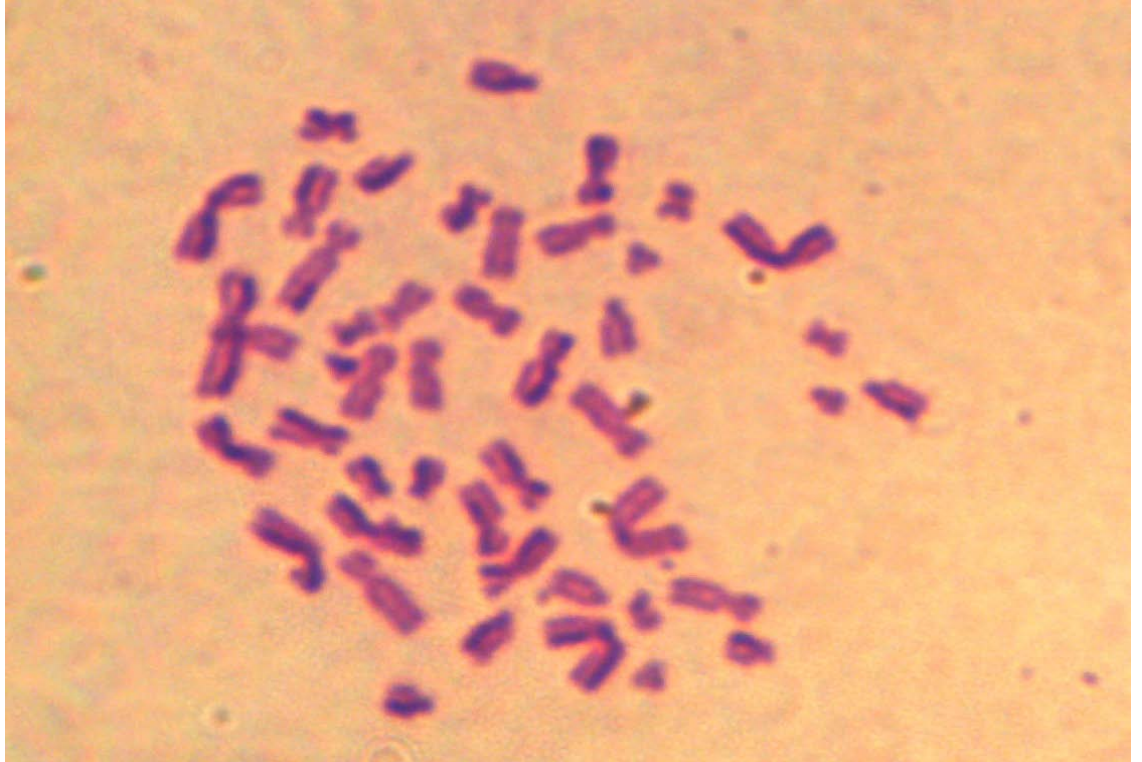
aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz evresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır. Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.22). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 3. S fazı) ikinci mitozda açık boyanan yani sadece BrdU içeren kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır. İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğerkromatidinin bir ipliği BrdU'lu diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozomda boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğerkromatidi açık renkte olacaktır. 3. mitozu geçiren hücrenin metafaz evresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğerkromatidi koyu renkte boyanacaktır (Şekil 3.23).



Şekil 3.21. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)



Şekil 3.22. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)



Şekil 3.23. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)

3.2.12. *In vitro* mikronükleus (MN) testi hücre kültürünün yapılması

Çalışmada son genotoksisite testi olarak Fenech (2000) ve Kirsch-Volders *et al.* (1997) tarafından geliştirilen mikronükleus testi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu test ile BİF, PER, İMİ, ACE insektisitleri ve bu insektisitlere karşı kullanılan PO_{met} ve PO_{su}'nun insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşturdukları mikronükleus sayıları belirlenmiştir.

Bu yöntemle göre, önceden kültür tüplerine steril olarak 6 mL kromozom medyum B konulmuştur. Her tüpe sağlıklı 4 farklı donörden alınan 1/10 heparinize 0,5 mL kan eklenip, tüpler çalkalanarak 37±1°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikronükleus oranını saptamak amacıyla 24. saatte her insektisit %2 DMSO'da çözülüp dilüe edilerek hazırlanan farklı konsantrasyonları, her uygulama için kültür tüplerine 0,25 mL ayrı ayrı eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. İsektisitlerin uygulama konsantrasyonları yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. Uygulama konsantrasyonları BİF, PER, İMİ için 50, 100, 250 ve 500 ppm, ASE için ise 25, 50, 100 ve 250 ppm'dir. Ayrıca negatif kontrol olarak distile su ve %2 DMSO, pozitif kontrol olarak ise 10 mM EMS kullanılmıştır. Her insektisit en yüksek uygulama grubuna kendisi kadar (1:1 v/v) PO_{met} ve PO_{su} ayrı ayrı uygulanarak ikinci bir deney düzeneği hazırlanmıştır. Kültür tüplerine eklenen insektisitler, PO_{met}, PO_{su}, distile su, DMSO ve EMS, kontaminasyonu önlemek için membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İnkübasyonun başlangıcından 48 saat sonra ise sitokinezi engellemek için sitokalazin-B'den son konsantrasyonu 3 µg/mL olacak şekilde tüm kültür tüplerine eklenerek karışması için hafifçe çalkalanmıştır. Tüpler tekrar etüve konarak (37±1°C) 72 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanması beklenmiştir.

3.2.13. MN preparatlarının hazırlanması ve boyanması

72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Tüplerde kalan pellet üzerine önceden hazırlanarak 37°C

sıcaklığa getirilen hipotonik çözeltilerden 5-6 mL yavaş yavaş eklenmiştir. Bu tüpler 37°C'ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1000 rpm'de tekrar 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant aynı şekilde atılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra tüplerde kalan pelletler üzerine, taze olarak hazırlanan ve -20°C bekletilen soğuk tespit çözeltilerinden 7 mL vortekslenerek ilave edilmiş ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj işleminden sonra oluşan süpernatant atılmıştır. Tespit çözeltileri ile muamele işlemi 3 defa tekrarlanarak tüplerde berrak bir görünüm elde edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant son olarak atılmış ve kalan pellet pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

Pipetle çekilen pellet, temizlenmiş ve -20°C'de tespit çözeltileri içerisinde bekletilen lamlara yaklaşık 20-25 cm yükseklikten damlatılmıştır. Damlaların birbirinin üzerine gelmeden lama iyice yayılmasına dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar protokol numarası verilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

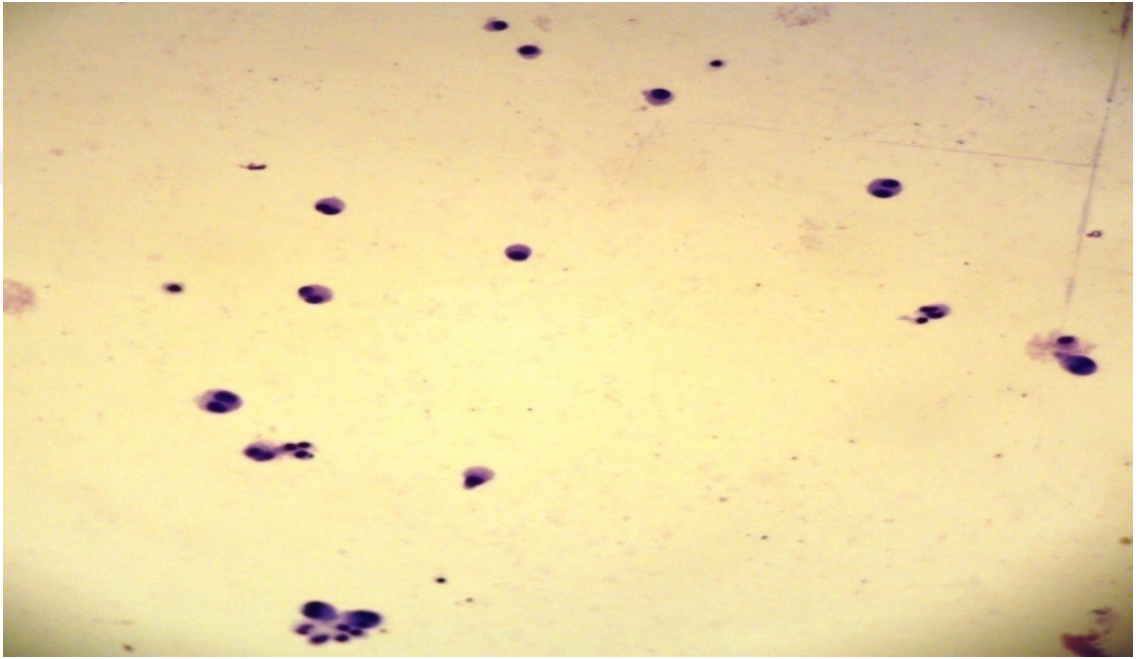
Kuruyan preparatlar taze olarak hazırlanan Giemsa boya çözeltilerinde 15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirilerek oda sıcaklığında dik şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatılmış ve incelemeye hazır daimi preparatlar haline getirilmiştir.

3.2.14. MN preparatlarının mikroskopik incelemesi

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Boeco marka trinoküler ışık mikroskopunda incelenirken önce 10'luk objektifte saha tespiti yapılmış (Şekil 3.24) daha sonra 40'lük objektif ile hücreler tek tek sayılmıştır. Bu incelemeler sırasında, her uygulama grubunun her bir donöründen ayrı ayrı hazırlanan preparatlarda 1000 adet iki nükleuslu (binükleer) hücre sayılmıştır. Binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmış ve kaydedilmiştir.

MN sayımı Countryman and Heddle (1976) tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Bu kriterler;

- MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması,
- Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması,
- MN'lerin asıl çekirdeğe bağlı veya bitişik olmaması,
- Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esaslarını kapsamaktadır (Fenech 2000; Demirel ve Zamani 2002).

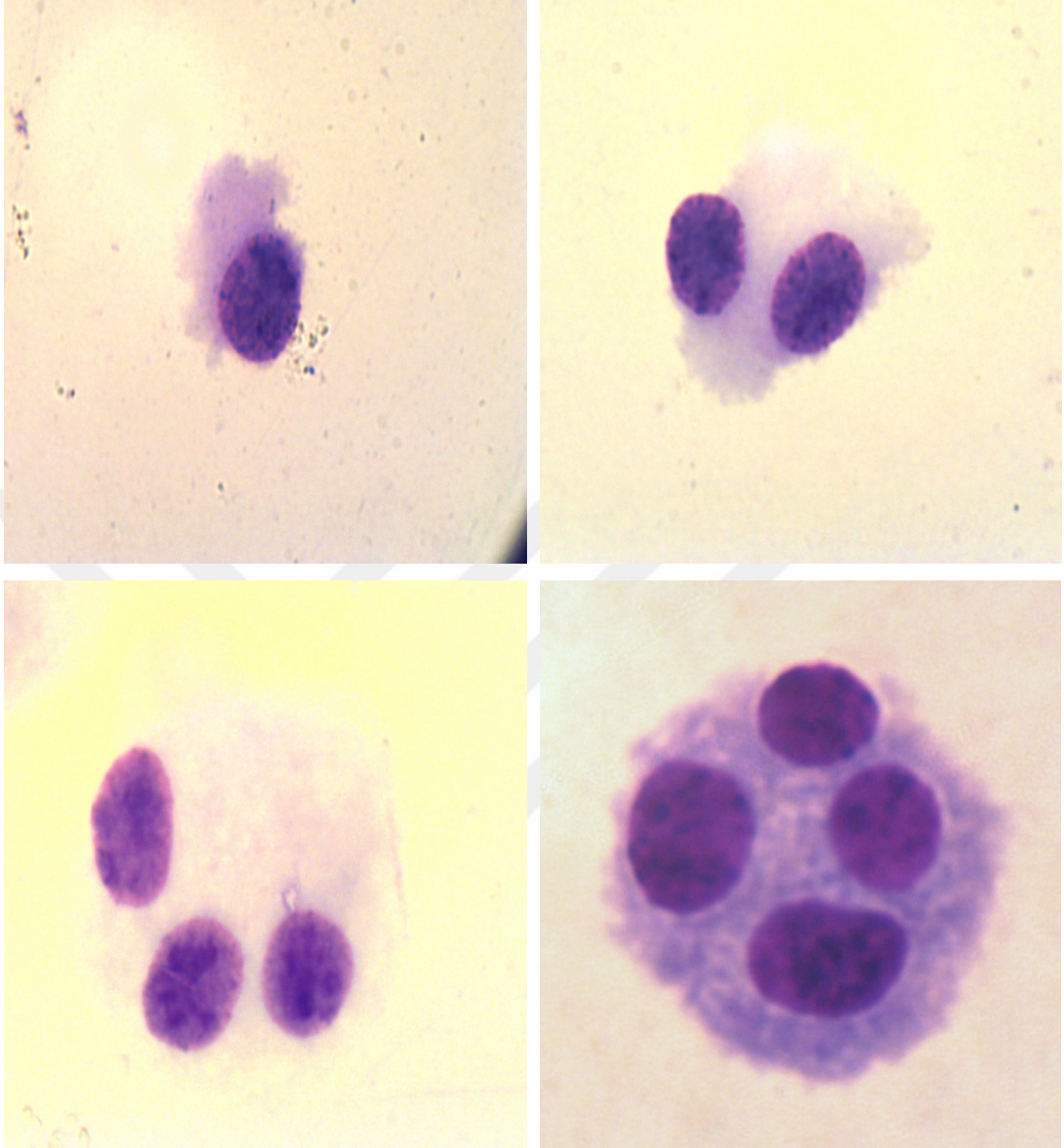


Şekil 3.24. MN testi mikroskopik inceleme sahası genel görünümü (10x10)

Ayrıca insektisitlerin sitotoksik etkilerini ve insektisitlere karşı PO_{met} ve PO_{su} 'nun etkilerini belirlemek amacıyla hazırlanan preparatlardan her donör için rasgele 1000 hücre sayılmış ve bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nükleuslu olanların oranı saptanmıştır (Şekil 3.25). Bu orandan yola çıkarak Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) hesaplanmıştır (Fenech 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$NBİ = (1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4)/1000$$

(N1: 1 nükleuslu hücre sayısı; N2: 2 nükleuslu hücre sayısı; N3: 3 nükleuslu hücre sayısı; N4: 4 nükleuslu hücre sayısı)



Şekil 3.25. Bir, iki, üç ve dört nükleus içeren hücreler (10x100)

3.2.15. KKD ve MN testleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

Çalışmalardan elde edilen KKD, MN, Rİ ve NBİ değerleriyle ilgili istatistiksel analizler için, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 programı kullanılmıştır. Kontrol grupları ve uygulama gruplarına ait elde edilen verilerin karşılaştırılması için tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi uygulanmıştır.

3.2.16. Mikrofotografi

SMART, KKD ve MN testleri ile ilgili fotoğraflar, Boeco marka (BM-180/T/SP) ışık mikroskopuna bağlı dijital fotoğraf makinesiyle (5,0 megapiksel), *D.melanogaster*'in ergin bireyelerine ait fotoğraflar ise Nikon marka (SMZ-10) stereo mikroskopuna bağlı dijital fotoğraf makinesiyle (5,0 megapiksel) çekilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmanın birinci aşamasında, ülkemizde tarımsal savaşında sıklıkla kullanılan insektisitlerin olası genotoksik etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* testlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla piretroid kimyasal grubuna ait Bifentrin (BİF) ve Permetrin (PER), neonikotinoid kimyasal grubundan da İmidakloprid (İMİ) ve Asetamiprid (ASE) insektisitleri kullanılmıştır. İsektisitlerin genotoksik etkilerini belirlemek için *in vivo* test tekniklerinden *Drosophila* kanat benek testi/somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile *in vitro* test tekniklerinden insan periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişim testi (KKD) ve mikronükleus testi (MN) ile çalışılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, insektisitlerin belirlenen genotoksik etkilerinin giderilip giderilmediğini belirlemek için Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin metanol (PO_{met}) ve su ekstraktları (PO_{su}) kullanılarak bu bitkiye ait antigenotoksik etkinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Çalışmada, insektisit ve bitki ekstraktlarının etkilerinin belirlenmesinde kullanılan kısa süreli testlerin her birisi için, iki ayrı deney seti hazırlanmıştır. Bu setlerden birisinde yalnızca insektisitlerin genotoksitesini, diğerinde ise insektisitlerin en yüksek uygulama dozu ile birlikte PO_{met} ve PO_{su} besiyeri ortamına ayrı ayrı ilave edilerek, semizotu bitkisinin su ve metanol ekstraktlarının insektisitler üzerindeki antigenotoksik etkileri belirlenmiştir.

4.1. SMART için İsektisitlerin LD₅₀ ve LD₁₀₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan ilk genotoksikite test tekniği olan SMART için, LD₅₀ ve LD₁₀₀ değerinin belirlenmesi amacıyla *D. melanogaster*'in ♀♀ *mwh/mwh* X ♂♂ *flr³/TM3* mutant bireyleri çaprazlanarak 72±4 saatlik (3. evre) trans-heterozigot larvalar elde edilmiştir. Bu larvalardan gelişen 100 ergin birey, farklı konsantrasyonlarda insektisit içeren hazır *Drosophila* besi yerinde beslenmiş ve 24 saat içinde yaşayabilen/yaşayamayan bireyler kaydedilmiştir. Çalışma 4 kez tekrarlanmış ve toplam 400 larva kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre, LD₅₀ değeri Bifentrin ve Permetrin için 5 ppm, İmidakloprid için 1,5 ppm, Asetamiprid için de 1,6 ppm olarak belirlenmiştir.

Tüm insektisitlerin LD₅₀ değerleri baz alınarak uygulama grupları oluşturulmuştur. LD₅₀ değeri, uygulama grupları için en yüksek doz kabul edilip daha düşük dozlarla da çalışılmıştır. Ancak belirlenen uygulama gruplarının hiçbirinde yeterli düzeyde mutant klon gözlenememiştir. Bu nedenle uygulama gruplarına ait doz aralıklarının oluşturulabilmesi amacıyla, insektisitlere ait LD₁₀₀ değerleri de belirlenmiştir. BİF, PER, İMİ ve ASE için LD₁₀₀ değerleri sırasıyla 10, 10, 3 ve 3,2 ppm olarak tespit edilmiştir. LD₁₀₀ değerlerine göre, her insektisit için dört farklı uygulama grubu oluşturulmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Trans-heterozigot larvalara uygulanan insektisitler için, belirlenen LD₁₀₀ değerleri ve SMART uygulama gruplarının hayatta kalma/larval mortalite oranları

Kontrol ve Uygulama Grupları	Konsantrasyon (ppm)	Larval Mortalite Oranı (%)	Erginleşen Birey Oranı (%)
Distile su	-	2	98
	DMSO	%1	2
	EMS	1	13
Bifentrin	4	10	90
	5	51	49
	6	62	38
	7	80	20
	10*	100	0
Permetrin	5	48	52
	6	59	41
	7	71	29
	8	87	13
	10*	100	0
İmidakloprid	0,5	1	99
	1	20	80
	1,5	45	55
	2	81	19
	3*	100	0
Asetamiprid	0,5	6	94
	1	23	77
	1,5	46	54
	2	86	14
	3,2*	100	0

* : Her insektisit için belirlenen LD₁₀₀ değeri

Ayrıca, çalışmada SMART için negatif ve pozitif uygulama grupları da hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su ve insektisitlerin çözücüsü olan %1'lik dimetil sülfoksit (DMSO), pozitif kontrol grubu olarak da mutajenik ve genotoksik etkisi iyi bilinen etil metansülfonat'ın (EMS) 1 ppm dozu kullanılmıştır. Larvalar için hayatta kalış oranı, negatif kontrol grupları olan distile su ve DMSO için %98, pozitif kontrol grubu olan EMS de ise %87 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

4.2. SMART Uygulamasından Elde Edilen Bulgular

Çalışmada SMART uygulaması için iki deney seti hazırlanmıştır. Birinci deney setinde, her insektisitinin LD₁₀₀ değerleri baz alınarak oluşturulan dört farklı konsantrasyonu Standart Drosophila besi yerine (SDB) eklenip, deney düzenekleri oluşturulmuştur. İkinci deney setinde ise semizotunun antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için, insektisitlerin en yüksek dozlarına %1PO_{met} ve %1PO_{su} ayrı ayrı eklenmiştir. Taze olarak hazırlanan SDB+insektisit ve SDB+insektisit+bitki ekstraktı gruplarının her birisine 72±4 saatlik trans-heterozigot 200 larva (3. evre) eklenmiş ve onlar erginleşinceye kadar 25±1°C'de etüvde bekletilmiştir. Erginleşen bireylerin kanatları şekillerine göre normal (*mwh/flr³*) ve serrat (*mwh/TM3*) olarak sınıflandırılıp, faure solüsyonu içinde binoküler mikroskop altında çıkarılmış ve lamlara yapıştırılmıştır. Entellan dökülüp lamelle kapatılarak kalıcı hale getirilen preparatlar ışık mikroskopunda 10X40 büyütme ile incelenerek gözlenen mutant klonlar kaydedilmiştir. Tüm insektisitlere ait SMART sonuçları Çizelge 4.2-4.6'da sunulmuştur.

4.2.1. Kontrol gruplarına ait SMART bulguları

Çalışmada negatif ve pozitif olmak üzere iki kontrol grubu oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubu olarak distile su ve tüm insektisitler için ortak çözücü olan DMSO, pozitif kontrol grubu olarakta EMS kullanılmıştır. SMART kontrol gruplarına ait *mwh/flr³* kanat preparatları incelendiğinde, distile suda toplam klon frekansı 0,11 olarak gözlemlenirken, DMSO'da bu oranın 0,13 olduğu görülmüştür. Negatif kontrol grupları

arasındaki fark istatistikî olarak önemsizdir ($P>0,05$). Pozitif kontrol olan EMS uygulamasında ise distile suya göre tüm klonlarda mutasyon artışı gözlenmiştir. Örneğin; 0,54 olarak gözlenen toplam klon frekansı istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Yine bu kanat fenotipinde negatif kontrol grubu olan distile su ve DMSO'nun KİF değerleri sırasıyla 0,46 ve 0,51 olarak bulunurken ($P>0,05$), EMS için bu değer 2,00 olarak belirlenmiş ve distile su ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Ayrıca rekombinasyon farkını belirlemek için incelenen *mwh/TM3* kanat fenotipinde ise toplam klon frekansı hem distile suda hemde DMSO'da 0,09 ve EMS'de ise 0,36 olarak belirlenmiştir. Bu kanat fenotipinde KİF değeri ise distile su, DMSO ve EMS için sırasıyla 0,35, 0,35 ve 1,49 olarak bulunmuştur. EMS grubuna ait bu değer distile su ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark $P<0,05$ değerinde önemlidir.

Negatif kontrol grupları arasında (distile su ve DMSO) her iki kanat fenotipinde de istatistiki fark olmaması ve mutasyon sayısı/frekanslarının yakın olması sebebiyle, istatistiki karşılaştırmalar tüm insektisitlerin çözücüsü olan DMSO'ya göre yapılmıştır.

Çizelge 4.2. SMART’da kontrol gruplarına ait bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları

Kontrol grupları	Kanat sayısı	KTT klon ($m = 2$)			BTT klon ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Σ <i>mwh</i> klon ($m = 2$)			Σ klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		1	(0,01)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO (%1)	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS (1ppm)	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)		Dengeleyici <i>TM3</i> kromozomu			7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO (%1)	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i	varlığında <i>flr</i> ³			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS (1ppm)	80	19	(0,24)	+	10	(0,13)	+	mutasyonu gözlenmez.			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, <i>D</i> : Frei ve Würger (1988)’e göre istatistiksel bulgular, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.																	

4.2.2. Bifentrin insektisitine ait SMART bulguları

İnsektisitlerin uygulama gruplarının belirlenmesi amacıyla hem LD₅₀ hemde LD₁₀₀ değerleri belirlenmiştir. Ancak LD₅₀ değeri baz alınarak hazırlanan uygulama gruplarında yeterli mutasyon sayısı/frekansına ulaşamamıştır. BİF için 10 ppm olarak belirlenen LD₁₀₀ değeri baz alınarak dört farklı konsantrasyonda (4, 5, 6 ve 7 ppm) uygulama grupları oluşturulmuştur. BİF uygulama gruplarından elde edilen bulgular, Çizelge 4.3’de verilmiştir. Tüm BİF uygulama gruplarında doz artışına bağlı olarak, hem *mwh/flr*³ kanat, hemde *mwh/TM3* kanat fenotipinde, DMSO negatif kontrol grubuna göre, küçük tek tip, toplam *mwh*, toplam klon sayısı ve klon sayısına bağlı mutasyon frekanslarında artış gözlenmiştir. Örneğin toplam klon frekansı, DMSO kontrol grubunda 0,13 iken, BİF uygulama gruplarında, sırasıyla 0,14; 0,16; 0,23; 0,26 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Yapılan istatistiksel hesaplamalarda sadece BİF’in en yüksek uygulama grubu olan 7 ppm’de, küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sonuçları anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Diğer uygulama gruplarında (4-6 ppm için) ise tüm klonlardaki mutasyon frekansı artışına rağmen sonuçlar istatistiki olarak P>0,05 düzeyinde önemsizdir. Ayrıca BİF uygulama grupları için KİF’de belirlenmiştir. DMSO’da 0,51 olan bu değer uygulama gruplarında 0,56’dan 1,07’ye yükselmiştir.

Uygulama gruplarına ait *mwh/TM3* kanat fenotipli bireyler için yapılan inceleme sonucunda ise, negatif kontrol grubu olan DMSO’ya göre istatistikî olarak önemsiz sonuçlar bulunmuştur (P>0,05). DMSO uygulamasında toplam klon mutasyon frekansı 0,09 iken, BİF uygulamalarında ise sırasıyla 0,11; 0,11; 0,13 ve 0,14’dür. KİF değerleri ise DMSO uygulamasında 0,35 iken, en yüksek BİF uygulaması olan 7 ppm’de 0,56 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Bifentrin uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon ($m = 2$)			BTT klon ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Σ mwh klon ($m = 2$)			Σ klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
(mwh/flr³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		0	(0,00)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
4	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
5	80	12	(0,15)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66
6	80	18	(0,23)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
7	80	21	(0,26)	+	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	21	(0,26)	+	21	(0,26)	+	1,07
(mwh/TM3) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i	Dengeleyici TM3			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	+	10	(0,13)	+	kromozomu			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
4	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	varlığında flr ³			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
5	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	mutasyonu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
6	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
7	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, D: Frei ve Würger (1988)'e göre istatistiksel bulgular, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.

4.2.3. Permetrin insektisitine ait SMART bulguları

PER insektisinin *in vivo* genotoksitesini belirlemek için LD₁₀₀ değeri olan 10 ppm baz alınarak hem ona yakın hemde daha düşük olan dört farklı uygulama grubu (5, 6, 7 ve 8 ppm) oluşturulmuştur. SMART'da *mwh/flr³* kanat fenotipi için, en düşük uygulama hariç tüm PER uygulamasında doz artışına bağlı olarak, negatif kontrol grubu olan DMSO'ya göre küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh*, toplam klon sayısı ve buna bağlı mutasyon frekansında artış gözlenmiştir. Şöyle ki küçük tek tip klon frekansı DMSO'da 0,11 iken, 5-8 ppm PER uygulama gruplarında ise bu değerler 0,13'den 0,30'a yükselmiştir. DMSO ile karşılaştırıldığında, ilk üç uygulama dozunda önemsiz (i) olan bu fark (P>0,05), 8 ppm uygulama dozunda pozitif (+) farka dönüşmüştür (P<0,05). Toplam klon ve toplam *mwh* klon frekansı ise DMSO'da 0,13 iken 8 ppm PER'de 0,31'e yükselmiştir. Bu yükseliş istatistiki olarak P<0,05 düzeyinde önemlidir (Çizelge 4.4).

PER uygulama gruplarına ait *mwh/TM3* kanat fenotipli bireyler için yapılan incelemede ise, negatif kontrol grubu olan DMSO'ya göre istatistikî olarak önemsiz sonuçlar bulunmuştur (P>0,05). DMSO uygulamasında toplam klon mutasyon frekansı 0,09, en yüksek PER (8 ppm) uygulamasında ise 0,14'dür.

mwh/flr³ kanat fenotipi için DMSO uygulama grubunda 0,51 olan KİF değeri, PER uygulama grupları için (5, 6, 7 ve 8 ppm) sırasıyla 0,51; 0,51; 0,92; 1,28, *mwh/TM3* kanat fenotipinde ise DMSO'da 0,35, PER uygulama dozlarında sırasıyla 0,35; 0,46; 0,51; 0,56'dır.

Ayrıca çalışmamızda kullanılan piretroid insektisitler içinde (BİF ve PER) en yüksek mutasyon sayısı 8 ppm PER uygulama grubunda 25 toplam klon mutasyonu ile gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. Permetrin uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon ($m = 2$)			BTT klon ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Σmwh klon ($m = 2$)			Σ klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(mwh/flr^3) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		0	(0,00)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
5	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
6	80	10	(0,13)	i	0	(0,01)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
7	80	18	(0,23)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
8	80	24	(0,30)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	25	(0,31)	+	25	(0,31)	+	1,28
($mwh/TM3$) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i	Dengeleyici <i>TM3</i>			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	+	10	(0,13)	+	kromozomu			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
5	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	-	varlığında flr^3			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
6	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	mutasyonu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
7	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
8	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, *D*: Frei ve Würzler (1988)'e göre istatistiksel bulgular, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.

4.2.4. İmidakloprid insektisitine ait SMART bulguları

Diğer insektisit gruplarında olduğu gibi İMİ insektisiti için de uygulama grupları oluşturulurken LD₅₀ değerleri belirlenmiştir. Ancak LD₅₀ değeri baz alınarak hazırlanan SMART uygulamasında negatif kontrol gruplarına göre tüm klon frekanslarında istatistiksel olarak önemsiz (i) fark gözlenmiştir (P>0,05). Genotoksik etkinin belirlenmesi için LD₁₀₀ değeri baz alınarak dört farklı konsantrasyonda (0,5; 1; 1,5 ve 2 ppm) İMİ uygulama grupları oluşturulmuştur. Uygulama sonuçlarında *mwh/flr*³ kanat fenotipinde doz artışına bağlı olarak, negatif kontrol grubu olan DMSO'ya göre küçük tek tip, toplam *mwh*, toplam klon sayısı ve buna bağlı mutasyon frekanslarında artış gözlenmiştir. Örneğin toplam klon frekansı, negatif kontrol grubu olan DMSO'da 0,13 iken, İMİ uygulama dozlarında sırasıyla 0,11; 0,13; 0,23; 0,29 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Yapılan istatistiksel hesaplamalarda ise sadece İMİ'nin en yüksek uygulama grubu olan 2 ppm'de sonuçlar anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Bir alt doz olan 1,5 ppm İMİ uygulamasında, tüm klonlardaki mutasyon frekansı artışına rağmen (Büyük tek tip ve ikiz klon hariç) sonuçlar istatistikî olarak P>0,05 düzeyinde önemsizdir. Yine *mwh/flr*³ kanat fenotipinde, DMSO'da KİF değeri 0,51 iken İMİ uygulama gruplarında sırasıyla 0,46; 0,51; 0,92; 1,18 olarak hesaplanmıştır.

İMİ uygulamasının *mwh/TM3* kanat fenotipli bireyleri için yapılan inceleme sonucunda ise, negatif kontrol grubu olan DMSO'ya göre istatistikî olarak önemsiz sonuçlar bulunmuştur (P>0,05). DMSO uygulamasında toplam klon frekansı 0,09, İMİ uygulamalarında (0,5; 1; 1,5 ve 2 ppm) ise sırasıyla 0,11; 0,11; 0,13 ve 0,13'dür. *mwh/TM3* kanat fenotipinde KİF değerleri ise DMSO'da 0,35 iken, en yüksek İMİ (2 ppm) uygulamasında 0,51'dir.

Çizelge 4.5. İmidakloprid uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon ($m = 2$)			BTT klon ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Σ <i>mwh</i> klon ($m = 2$)			Σ klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		0	(0,00)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
0,5	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,0	80	10	(0,13)	i	0	(0,01)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
1,5	80	18	(0,23)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
2,0	80	22	(0,28)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	23	(0,29)	+	23	(0,29)	+	1,18
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i	Dengeleyici <i>TM3</i>			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	+	10	(0,13)	+	kromozomu			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
0,5	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	varlığında <i>flr</i> ³			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,0	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	mutasyonu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,5	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2,0	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, *D*: Frei ve Würglers (1988)'e göre istatistiksel bulgular, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.

4.2.5. Asetamiprid insektisitine ait SMART bulguları

ASE insektisiti için yapılan ön çalışmalar ile LD₁₀₀ değeri baz alınarak dört farklı konsantrasyonda (0,5; 1; 1,5 ve 2 ppm) uygulama grupları oluşturulmuştur. *mwh/flr*³ kanat fenotipi için, tüm ASE uygulama gruplarında doz artışına bağlı olarak küçük tek tip, toplam *mwh*, toplam klon sayısı ve buna bağlı mutasyon frekansında artış gözlenmiştir. Örneğin toplam klon frekansı, negatif kontrol grubu olan DMSO uygulamasında 0,13 iken, ASE uygulama gruplarında (0,5; 1; 1,5 ve 2 ppm) sırasıyla 0,11; 0,14; 0,23; 0,30 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6). Yapılan istatistiksel hesaplamalarda sadece ASE'nin en yüksek uygulama grubu olan 2 ppm'de sonuçlar anlamlı bulunmuştur (P<0,05). 1 ve 1,5 ppm için ise tüm klonlardaki mutasyon frekansı artışına rağmen sonuçlar istatistikî olarak P>0,05 düzeyinde önemsizdir. Çalışmada kullanılan neonikotinoid grubu insektisitler (İMİ ve ASE) içinde *mwh/flr*³ kanat fenotipinde en yüksek mutasyon sayısı toplam klonda 24 mutasyon ile ASE'de belirlenmiştir.

İstatistiksel hesaplamalar yapılırken belirlenen hem kontrol hem de uygulama grupları için aynı fenotipdeki KİF değerleri DMSO uygulama grubunda 0,51; ASE uygulamalarında ise (0,5; 1; 1,5 ve 2 ppm) sırasıyla 0,46; 0,56; 0,92 ve 1,23 olarak hesaplanmıştır.

Rekombinasyon farkının belirlenmesi için çalışılan *mwh/TM3* kanat fenotipli bireyler için yapılan inceleme sonucunda ise, tüm ASE uygulamalarında, negatif kontrol grubu olan DMSO'ya göre istatistikî olarak önemsiz sonuçlar bulunmuştur (P>0,05). *mwh/TM3* fenotipli kanatlarda DMSO uygulamasında, toplam klon mutasyon frekansı 0,09, ASE uygulamalarında ise bu değerler sırasıyla 0,11; 0,11; 0,13 ve 0,14'dür. Aynı kanat fenotipinde KİF değerleri ise DMSO'da 0,35 iken, 2 ppm ASE uygulamasında 0,56'dır.

Çizelge 4.6. Asetamiprid uygulama grubuna ait SMART bulguları ve istatistiksel analiz sonuçları

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon ($m = 2$)			BTT klon ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Σ <i>mwh</i> klon ($m = 2$)			Σ klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
(<i>mwh/flr</i>³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		0	(0,00)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
0,5	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,0	80	11	(0,14)	i	0	(0,01)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
1,5	80	18	(0,23)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	18	(0,23)	i	18	(0,23)	i	0,92
2,0	80	23	(0,29)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	24	(0,30)	+	24	(0,30)	+	1,23
(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i	Dengeleyici <i>TM3</i>			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	+	10	(0,13)	+	kromozomu			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
0,5	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	varlığında <i>flr</i> ³			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,0	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	mutasyonu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
1,5	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2,0	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, <i>D</i> : Frei ve Würzler (1988)'e göre istatistiksel bulgular, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.																	

Çalışmada kullanılan ilk genotoksisite testi olan SMART uygulanırken, LD₁₀₀ değerleri baz alınarak, tüm insektisitler için dört farklı uygulama grupları oluşturulmuştur. LD₅₀ değerlerinin üzerinde, tüm kanat fenotiplerinde mutasyon sayısına bağlı frekanslarında artış gözlenmiştir. Ancak tüm insektisit uygulamaları içerisinde sadece *mwh/flr*³ kanat fenotipinde istatistiksel olarak pozitif (+) sonuçlar elde edilmiştir (P<0,05). *mwh/TM3* kanat fenotipinde ise pozitif etki gözlenememesi, insektisitlerin rekombinojenik etkili olmadığını göstermektedir. İsektisitlerin uygulama dozları karşılaştırıldığında ise genel olarak en düşük doz uygulamasına sahip ASE, en yüksek mutajenik etkiyi göstermiştir (2 ppm ASE > 2 ppm İMİ > 7 ppm BİF > 8 ppm PER) .

4.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testinden Elde Edilen Bulgular

Deneylelerimizde kullandığımız ikinci test tekniği olan KKD, *in vitro* mutajenik çalışmalar içinde yaygın olarak kullanılan sitogenetik testlerden biridir. Deneylelerimizde kullanılan dört farklı insektisit uygulama grupları, literatür bilgisi ve yapılan ön denemeler ile belirlenmiştir. İsektisitlerin uygulama dozları BİF, PER ve İMİ için 50, 100, 250 ve 500 ppm iken, ASE için 25, 50, 100 ve 250 ppm'dir. Çalışmamızda kullandığımız insektisitlerin KKD üzerine etkilerini belirlemek için, dört farklı donörden alınan kanlarla hazırlanan insan periferal kan kültürlerine belirlenen konsantrasyonlarda BİF, PER, İMİ ve ASE insektisitlerinin uygulaması sonucu her bir donörden 25 adet olmak üzere toplam 100 adet ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı incelenerek KKD/hücre oranları tespit edilmiştir. Sitotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla hesaplanan replikasyon indeksi (Rİ) için ise her donörden rastgele seçilmiş 100 metafaz plağı (toplam 400) incelenmiş, kontrol ve her bir insektisit grubu için ortalama Rİ değerleri hesaplanmıştır. KKD frekansları ve Rİ verileri Çizelge 4.7-4.16'de sunulmuştur. EMS ve insektisit uygulama gruplarına ait ikinci mitozu geçirmiş örnek metafaz plakları Şekil 4.1-4.5 de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Etil metansülfonat'a ait ikinci mitoz geçirmiş metafaz plağı

4.3.1. Kontrol gruplarına ait KKD bulguları

Çalışmada uygulama gruplarına ait KKD değerleri, kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla iki ayrı kontrol grubu oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubu distile su ve tüm insektisitlerin çözücüsü olan DMSO iken, pozitif kontrol grubu mutajenik etkisi iyi bilinen ve SMART'da da kullanılan EMS ile hazırlanmıştır. Distile su ve DMSO için ortalama KKD'ler sırasıyla $3,60 \pm 0,02$, $3,70 \pm 0,01$ olup aralarındaki fark istatistikî olarak önemsizdir ($P > 0,05$). EMS için bu değer $32,61 \pm 0,01$ olup, distile su ile karşılaştırıldığında $P < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.7). Tüm uygulamalarda, ikinci mitozu geçirmiş metafaz plakları içinde en fazla KKD, 51 KKD/hücre ile EMS pozitif kontrol grubunda gözlenmiştir.

Distile su, DMSO ve EMS için hesaplanan Rİ değerleri ise sırasıyla $2,41\pm 0,03$, $2,24\pm 0,07$ ve $2,01\pm 0,07$ 'dir (Çizelge 4.8). Bu sonuçlara göre Rİ değerleri için kontrol grupları arasında fark istatistikî olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Alkilleiyici ajanlardan olan EMS'de negatif kontrol grupları gibi mitoz bölünme engellenmemiştir. EMS alkilleiyici yapısı gereği sadece nokta mutasyonlara sebep olur. Bu sebeple pozitif kontrol grubu olan EMS'nin Rİ değeri, distile suya göre istatistiksel olarak değişmemiştir.

Çizelge 4.7. Kontrol gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10
EMS (10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51

Min. = en az, Maks. = en çok, * Distile suya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.8. Kontrol gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

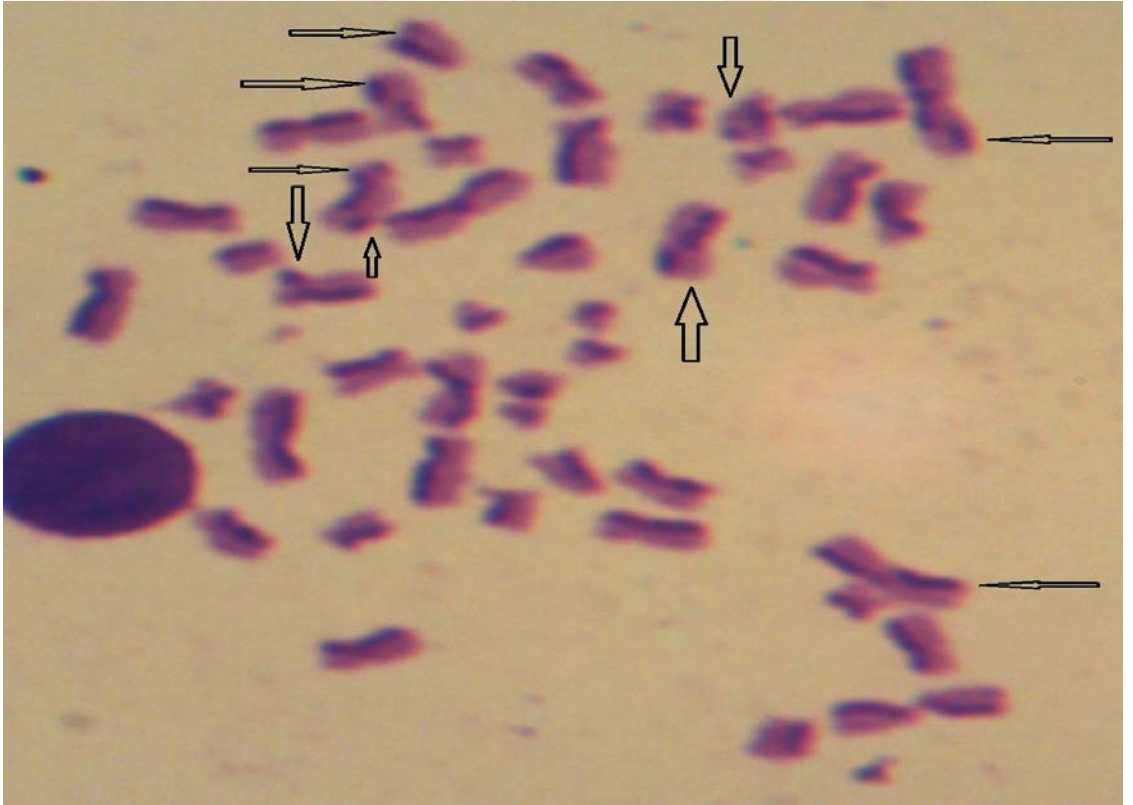
Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ
Distile su	60	116	224	2,41±0,03
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07
EMS (10mM)	81	140	178	2,01±0,07

4.3.2. Bifentrin insektisitine ait KKD bulguları

Çalışmada kullandığımız piretroid insektisitlerden BİF, insan periferik lenfosit hücrelerine 50, 100, 250 ve 500 ppm olmak üzere dört farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Tüm uygulamalarda KKD ortalamaları, dört farklı donörden hazırlanan lenfosit kültürlerinde, ikinci mitozu geçiren rastgele 25, toplam 100 metafaz plağında sayılmıştır. 500 ppm BİF uygulamasında dört donörde sırasıyla 6,99; 7,04; 7,07; 7,11

KKD/hücre tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). BİF uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş örnek metafaz plağı Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu uygulama sonucu lenfosit hücrelerinden elde edilen ortalama KKD’ler uygulama dozları için (50, 100, 250 ve 500 ppm) sırasıyla $4,13 \pm 0,01$; $4,62 \pm 0,01$; $6,50 \pm 0,03$ ve $7,05 \pm 0,02$ ’dir. Bu ortalamalar pozitif kontrol grubu olan EMS’de $32,61 \pm 0,01$, distile su ve DMSO kontrol grubunda ise $3,60 \pm 0,02$ ve $3,70 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir. Tüm BİF uygulamalarından bir metafaz plağında elde edilen en az KKD 50 ppm uygulama grubunda gözlenmiştir (1 KKD/hücre). BİF uygulamalarından elde edilen KKD’ler DMSO ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak pozitif sonuçlar gözlenmiştir ($P < 0,05$).

BİF uygulama grupları için hesaplanan Rİ değerleri en yüksek uygulama grubu hariç genel olarak düşük bulunmuştur. Rİ, DMSO’da $2,24 \pm 0,07$, BİF uygulama dozlarında ise sırasıyla $1,95 \pm 0,06$; $1,90 \pm 0,04$; $2,01 \pm 0,07$; $2,58 \pm 0,0$ ’dir (Çizelge 4.10). BİF uygulama dozlarının Rİ değerleri DMSO ile karşılaştırıldığında, $P > 0,05$ düzeyinde önemsizdir.



Şekil 4.2. Bifentrin uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı

Çizelge 4.9. Bifentrin uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD	
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11	
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10	
EMS(10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51	
BIFENTRİN (ppm)	50	4,10	4,17	4,11	4,14	4,13±0,01*	1-9
	100	4,65	4,60	4,63	4,60	4,62±0,01*	1-13
	250	6,43	6,54	6,47	6,56	6,50±0,03*	1-11
	500	6,99	7,04	7,07	7,11	7,05±0,02*	4-13

Min. = en az, Maks. = en çok, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.10. Bifentrin uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

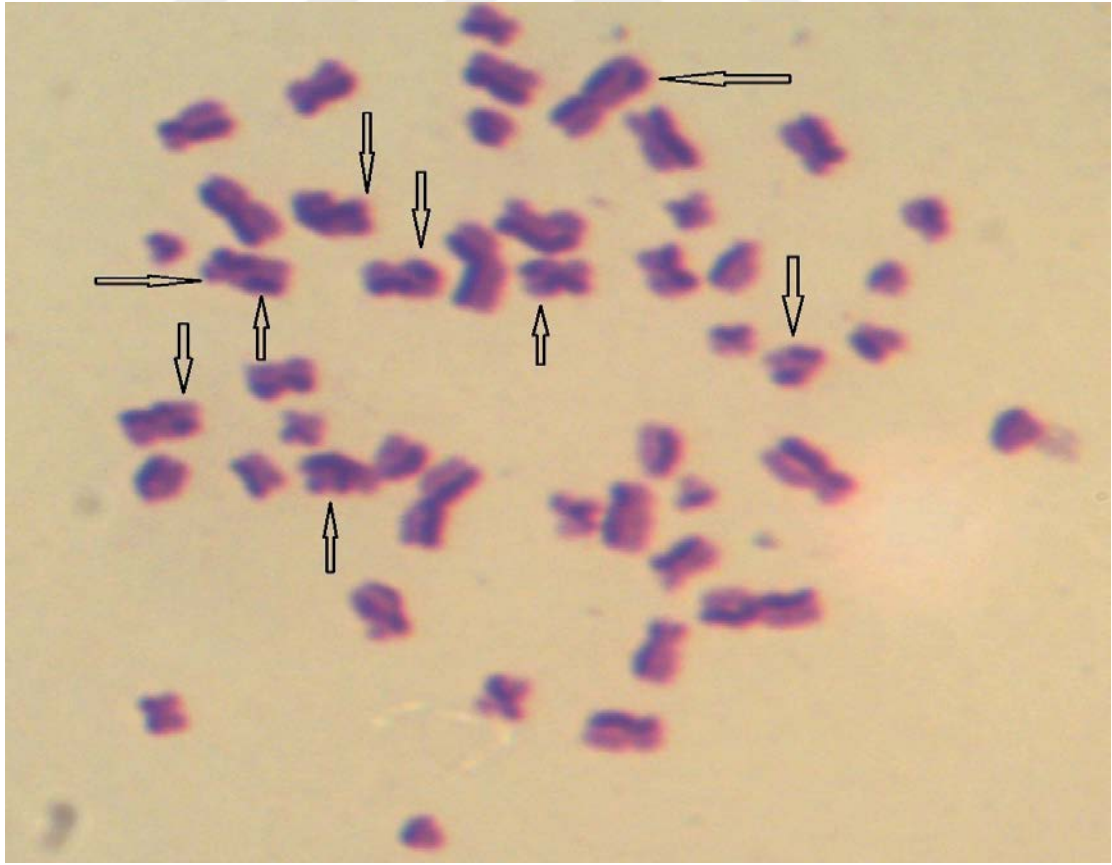
Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ
Distile su	60	116	224	2,41±0,03
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07
EMS (10mM)	81	140	178	2,01±0,07
BIFENTRİN (ppm)	50	148	124	1,95±0,06
	100	128	184	1,90±0,04
	250	88	220	2,01±0,07
	500	84	240	2,58±0,04

4.3.3. Permetrin insektisitine ait KKD bulguları

Çalışmada kullanılan ikinci piretroid insektisit olan PER'in, dört farklı konsantrasyonda (50, 100, 250 ve 500 ppm) insan periferik lenfosit hücrelerine uygulaması sonucu elde edilen ortalama KKD'ler sırasıyla 3,97±0,03; 4,56±0,02; 5,82±0,03 ve 6,15±0,02 iken,

bu oran DMSO'da ise $3,70 \pm 0,01$ olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Tüm PER uygulamaları DMSO'ya göre $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir. İkinci mitozu geçirmiş metafaz plakları içerisindeki, en az ve en çok KKD'lere bakıldığında, 50 ppm PER uygulamasında 1-8 olduğu görülmektedir. Bu değerler 500 ppm PER uygulama grubunda 3-12'dir. 500 ppm PER uygulamasında her donörde belirlenen ortalama KKD'ler 6,19, 6,14, 6,17, 6,11 olarak belirlenmiştir. PER uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş örnek metafaz plağı Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Ayrıca PER uygulama grupları için Rİ değerleri hesaplandığında, DMSO'da $2,24 \pm 0,07$ iken PER'de ise sırasıyla $1,95 \pm 0,05$; $1,88 \pm 0,07$; $2,03 \pm 0,04$; $2,02 \pm 0,05$ düzeyine kadar düşmüştür (Çizelge 4.12). Bu değerler DMSO ile karşılaştırıldığında, $P > 0,05$ düzeyinde önemsizdir.



Şekil 4.3. Permetrin uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı

Çizelge 4.11. Permetrin uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD	
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11	
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10	
EMS (10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51	
PERMETRİN (ppm)	50	3,90	4,01	4,02	3,96	3,97±0,03*	1-8
	100	4,65	4,50	4,61	4,51	4,56±0,02*	1-10
	250	5,73	5,84	5,87	5,86	5,82±0,03*	1-11
	500	6,19	6,14	6,17	6,11	6,15±0,02*	3-12

Min. = en az, Maks. = en çok, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.12. Permetrin uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

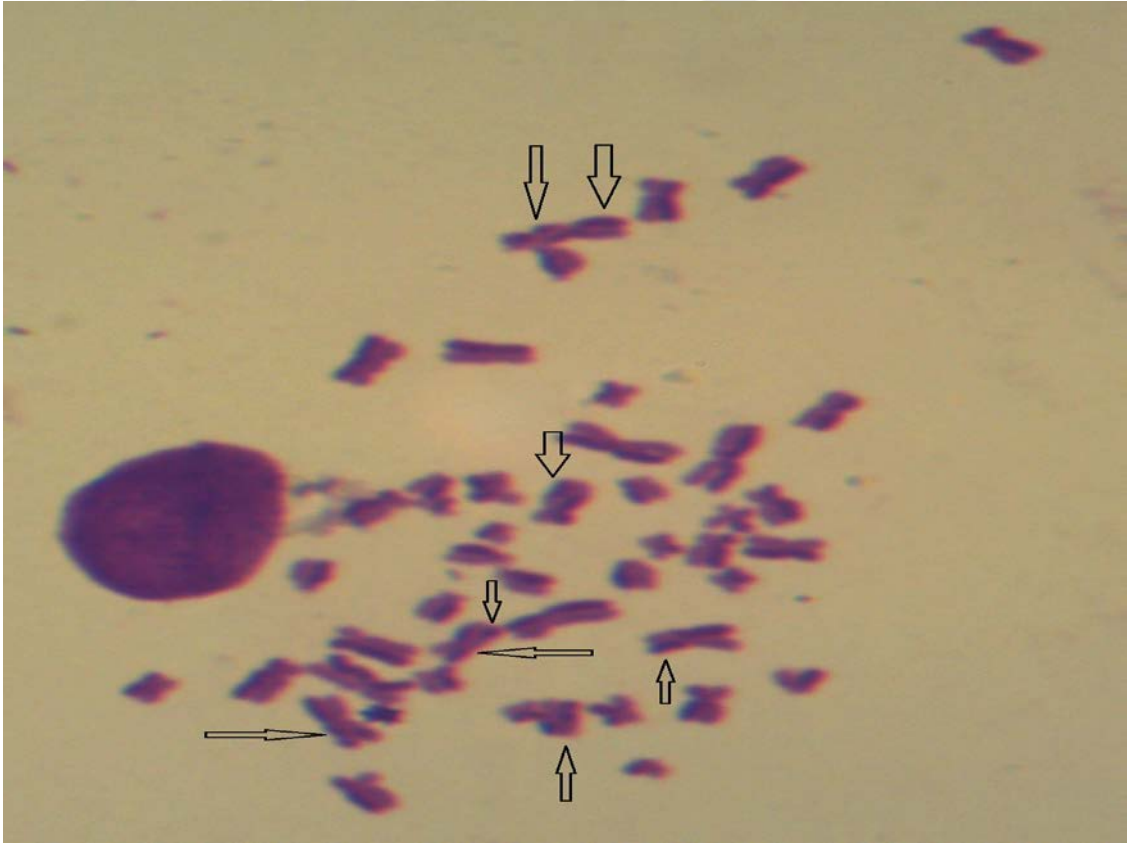
Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ
Distile su	60	116	224	2,41±0,03
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07
EMS (10mM)	81	140	178	2,01±0,07
PERMETRİN (ppm)	50	145	130	1,95±0,05
	100	138	172	1,88±0,07
	250	88	212	2,03±0,04
	500	88	234	2,02±0,05

4.3.4. İmidakloprid insektisitine ait KKD bulguları

Neonikotinoid insektisitlerden İMİ'nin insan periferik lenfosit hücrelerinde genotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla ön denemeler yapılmıştır. 50, 100, 250 ve 500 ppm olmak üzere belirlenen dört farklı konsantrasyonda İMİ uygulanması sonucu elde edilen ortalama KKD'ler sırasıyla 4,43±0,01; 4,68±0,01; 5,92±0,01 ve 7,12±0,01 iken, bu oranların DMSO'da ise 3,70±0,01 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). Tüm İMİ

uygulamalarına ait sonuçlar, DMSO grubuna ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında $P < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. İMİ'nin ikinci mitozu geçirmiş metafaz plaklarında (Şekil 4.4) en yüksek KKD, 500 ppm İMİ'de 17 KKD/hücre olarak gözlenmiştir. 500 ppm İMİ uygulama grubunda her donörde belirlenen ortalama KKD'ler sırasıyla 7,14; 7,13; 7,10; 7,11'dir.

İMİ uygulama grupları için hesaplanan Rİ değerleri ise tüm kontrol gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. İMİ uygulama gruplarında Rİ sırasıyla $1,95 \pm 0,04$; $1,88 \pm 0,07$; $2,01 \pm 0,08$; $1,99 \pm 0,03$ iken DMSO'da $2,24 \pm 0,07$ 'dir (Çizelge 4.14). Ancak bu değerler $P > 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsizdir.



Şekil 4.4. İmidakloprid uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı

Çizelge 4.13. İmidakloprid uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD	
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11	
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10	
EMS (10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51	
İMİDAKLOPRİD (ppm)	50	4,41	4,46	4,40	4,45	4,43±0,01*	1-12
	100	4,70	4,69	4,65	4,68	4,68±0,01*	1-12
	250	5,96	5,93	5,89	5,90	5,92±0,01*	1-11
	500	7,14	7,13	7,10	7,11	7,12±0,01*	3-17

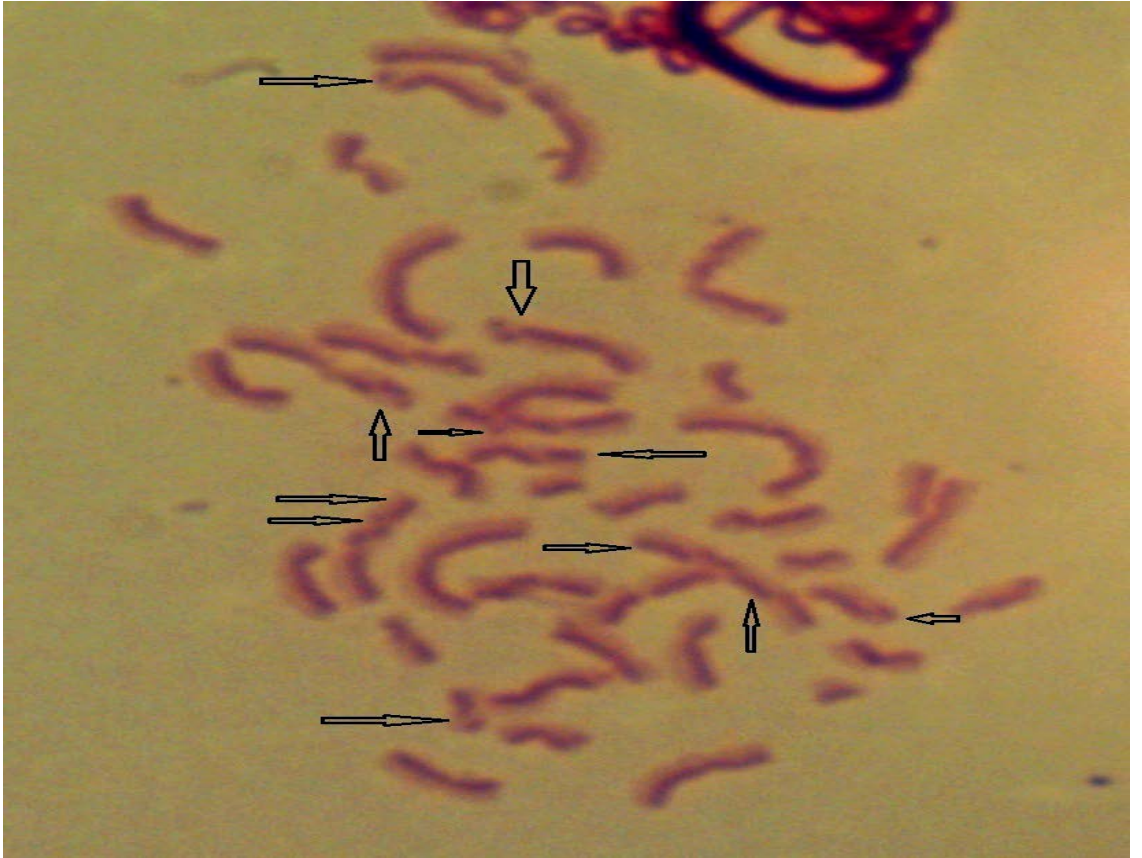
Min. = en az, Maks. = en çok, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.14. İmidakloprid uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ	
Distile su	60	116	224	2,41±0,03	
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07	
EMS (10mM)	81	140	178	2,01±0,07	
İMİDAKLOPRİD (ppm)	50	132	156	112	1,95±0,04
	100	108	232	60	1,88±0,07
	250	80	236	84	2,01±0,08
	500	92	220	88	1,99±0,03

4.3.5. Asetamiprid insektisitine ait KKD bulguları

Çalışmamızda genotoksisitesini belirlemek amacıyla kullandığımız ikinci neonikotinoid insektisit olan ASE'nin 25, 50, 100 ve 250 ppm konsantrasyonlarında uygulaması sonucu elde edilen ortalama KKD'ler sırasıyla $3,92 \pm 0,03$; $5,80 \pm 0,01$; $6,14 \pm 0,004$ ve $6,73 \pm 0,01$ olarak bulunmuştur. Bu oranlar DMSO'da ise $3,70 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). ASE'nin tüm uygulama gruplarında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak DMSO ile karşılaştırıldığında, önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). ASE uygulamasında ikinci mitozu geçirmiş metafaz plakları (Şekil 4.5) içerisindeki en az ve en çok KKD'lere bakıldığında, en yüksek uygulama grubu olan 250 ppm'de 14 KKD sayılmıştır. En az KKD'ye ise 25 ppm ASE uygulama grubunda rastlanmıştır (2 KKD). Tüm donörlerinden alınan kanlarla ayrı ayrı hazırlanan 250 ppm ASE uygulamasında, her donör için ortalama KKD'ler sırasıyla 6,74, 6,76, 6,70 ve 6,72'dir.



Şekil 4.5. Asetamiprid uygulama grubunda ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı

ASE uygulama gruplarında hesaplanan Rİ'ler negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. ASE uygulama gruplarında Rİ değerleri sırasıyla $1,93\pm 0,02$; $1,98\pm 0,03$; $2,18\pm 0,04$; $1,83\pm 0,06$ 'dır (Çizelge 4.16). ASE uygulamalarının Rİ değerleri DMSO ile karşılaştırıldığında sonuçlar istatistikî olarak $P>0,05$ düzeyinde önemsizdir.

Çizelge 4.15. Asetamiprid uygulama gruplarına ait KKD değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD	
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	$3,60\pm 0,02$	1-11	
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	$3,70\pm 0,01$	1-10	
EMS(10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	$32,61\pm 0,01^*$	7-51	
ASETAMIPRID (ppm)	25	4,01	3,86	3,90	3,91	$3,92\pm 0,03^*$	2-9
	50	5,78	5,80	5,83	5,79	$5,80\pm 0,01^*$	1-16
	100	6,14	6,13	6,14	6,15	$6,14\pm 0,04^*$	1-11
	250	6,74	6,76	6,70	6,72	$6,73\pm 0,01^*$	3-14

Min. = en az, Maks. = en çok, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çizelge 4.16. Asetamiprid uygulama gruplarına ait Rİ değerleri ve istatistiki analiz sonuçları

Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ	
Distile su	60	116	224	$2,41\pm 0,03$	
DMSO (%2)	62	126	194	$2,24\pm 0,07$	
EMS (10mM)	81	140	178	$2,01\pm 0,07$	
ASETAMIPRID (ppm)	25	108	212	80	$1,93\pm 0,02$
	50	92	224	84	$1,98\pm 0,03$
	100	84	160	156	$2,18\pm 0,04$
	250	140	188	72	$1,83\pm 0,06$

Yapılan bu çalışmada insektisitlerin genotoksisitesini belirlemek için kullanılan KKD testi, *in vitro* olarak uygulanan sitotoksik testlerden biridir. Bu test yönteminde insan periferel lenfosit hücrelerinde, mitoz bölünme esnasında meydana gelen kardeş kromozomlar arasındaki değişimler hedef alınmaktadır. Tüm insektisitlerin, doz artışına bağlı olarak her uygulama grubunda KKD sayısını artırdığı gözlenmiştir ($P<0,05$). Çalışmada kullanılan dört insektisit içinde en yüksek KKD oranı ise 17 KKD/hücre ile 500 ppm İMİ'de gözlenmiştir.

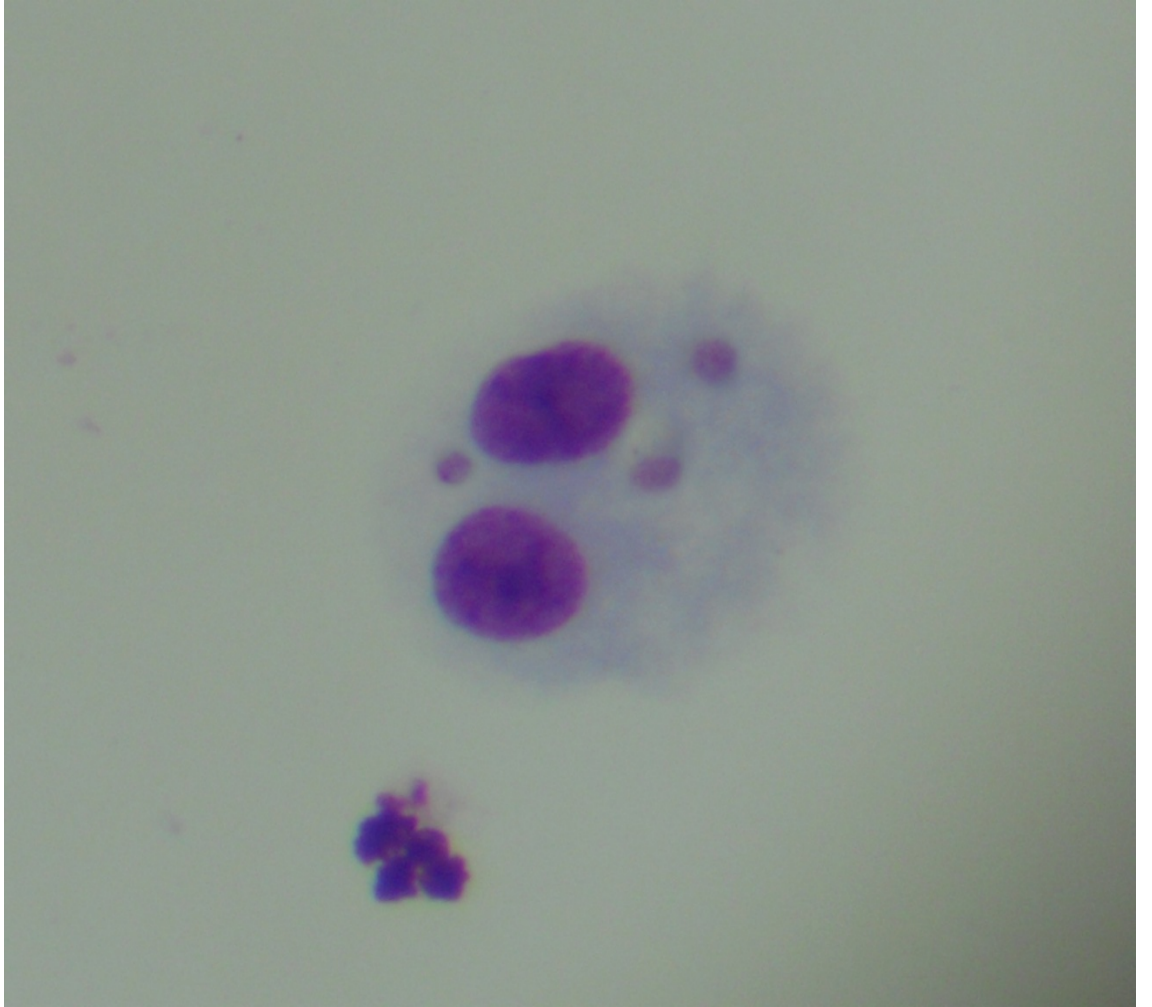
4.4. Mikronükleus Testi (MN) ile Elde Edilen Bulgular

Yapılan bu çalışmada, üçüncü genotoksisite testi olarak kullanılan MN için, dört farklı donörden alınan kanlarla hazırlanan insan periferel kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda BİF, PER, İMİ ve ASE insektisitleri uygulaması sonucu elde edilen iki nükleuslu (binükleus) hücreler içindeki MN sayıları, MN yüzdeleri ve Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) verileri Çizelge 4.17 – 4.21'da sunulmuştur. Negatif ve pozitif kontrol grupları kendi aralarında, tüm insektisitlere ait uygulama grupları ise negatif kontrol grubu olarak kullanılan DMSO ile karşılaştırılmış ve sonuçlar istatistikî olarak değerlendirilmiştir. MN frekansları tespit edilirken her insektisit uygulama grubu için hazırlanan preparatlarda 1000 adet binükleuslu hücre sayılmış, bu hücreler içinde mikronükleuslu olanlar saptanmış ve kaydedilmiştir. Ayrıca insektisitlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, her donörden hazırlanan preparatlarda rastgele 1000 hücre sayılmış ve bir, iki, üç ve dört nükleuslu hücre oranlarıyla NBİ'ler hesaplanmıştır.

4.4.1. Kontrol gruplarına ait MN bulguları

İnsektisitlere ait genotoksisitenin belirlenebilmesi için daha önce kullanılan SMART ve KKD test sistemlerinde olduğu gibi MN testi içinde negatif kontrol gruplarında distile su ve DMSO, pozitif kontrol grubunda ise EMS kullanılmıştır. Kontrol gruplarından DMSO ve EMS, distile su ile karşılaştırılırken, uygulama grupları DMSO ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.17). Toplam MN yüzdeleri distile suda $0,70\pm 0,38$,

DMSO'da $0,83 \pm 0,65$ olarak bulunmuştur. EMS pozitif kontrol grubunda ise bu değer $5,63 \pm 1,60$ 'dır. Distile su ve DMSO kontrol grubu arasındaki fark $P > 0,05$ düzeyinde önemsiz iken pozitif kontrol olan EMS ile negatif kontrol grubu distile su arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Binükleuslu hücrelerdeki MN sayılarına bakıldığında, negatif kontrol gruplarında sadece tekli MN gözlenip, ikili ve üçlü MN gözlenmezken, pozitif kontrol grubu olan EMS'de ise birli, ikili ve üçlü MN tipleri gözlenmiştir (Şekil 4.6). Tüm kontrol gruplarına ait NBİ değerleri ise distile su için $1,52 \pm 0,15$; DMSO için $1,54 \pm 0,17$ ve EMS için $1,29 \pm 0,25$ 'dir. DMSO ve EMS'ye ait NBİ sonuçları distile su ile karşılaştırıldığında DMSO'nun sitotoksik etki göstermediği ($P > 0,05$), EMS'nin ise gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0,05$).



Şekil 4.6 Etil metansülfonat'a ait üçlü mikronükleus

Çizelge 4.17. Kontrol gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları

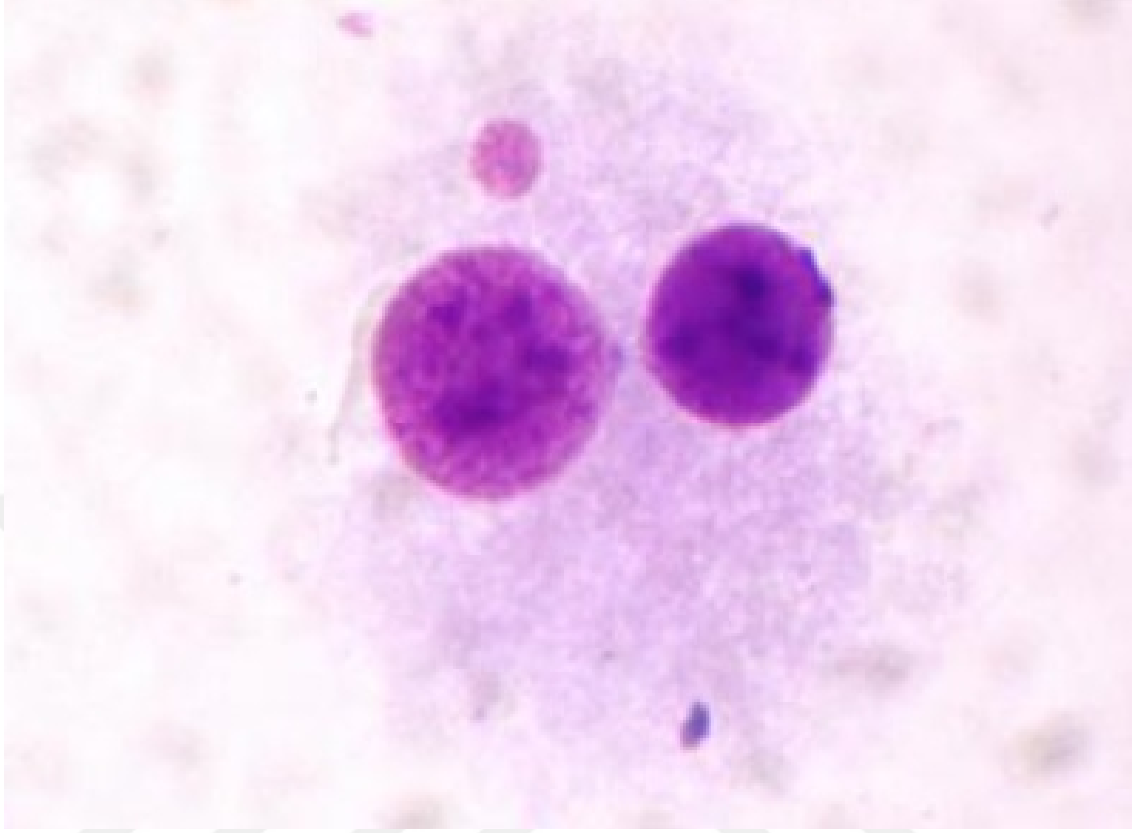
Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'lü		
Distile su	-	4000	28	-	-	0,70±0,38	1,52±0,15
DMSO	%2	4000	33	-	-	0,83±0,65	1,54±0,17
EMS	10mM	4000	142	22	13	5,63±1,60*	1,29±0,25*

BNH: binükleuslu hücre, * Distile su'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

4.4.2. Bifenthrin insektisitine ait MN bulguları

İnsan periferik lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 250 ve 500 ppm) BİF uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri sırasıyla 1,10±0,73; 1,48±0,85; 1,85±0,44 ve 2,05±0,68 iken, bu oranların DMSO için 0,83±0,65 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.18). BİF uygulama gruplarında toplam MN sayıları incelendiğinde, en fazla MN en yüksek uygulama grubu olan 500 ppm'de gözlenmiştir. Ayrıca uygulama gruplarında üçlü MN sadece en yüksek konsantrasyonda tespit edilmiştir (Şekil 4.7). BİF uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri DMSO ile karşılaştırıldığında, sonuçlar 50 ppm BİF uygulamasında önemsizken ($P>0,05$), diğer üç uygulamada ise önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Sitotoksik etkinin belirlenmesi için hesaplanan NBİ değerleri, tüm BİF uygulama gruplarına için sırasıyla 1,55±0,13; 1,46±0,21; 1,38±0,20 ve 1,25±0,18'dir. Çizelge 4.18 incelendiği zaman konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı ve nükleer bölünmenin azaldığı belirlenmiştir. BİF uygulama grubuna ait NBİ değerleri konsantrasyon artışına bağlı olarak düşerken, DMSO ile karşılaştırıldığında sadece en yüksek uygulama grubu olan 250 ve 500 ppm konsantrasyonlarda bu değerler istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) bulunmuştur.



Şekil 4.7. Bifentrin insektisitine ait üçlü mikronükleus

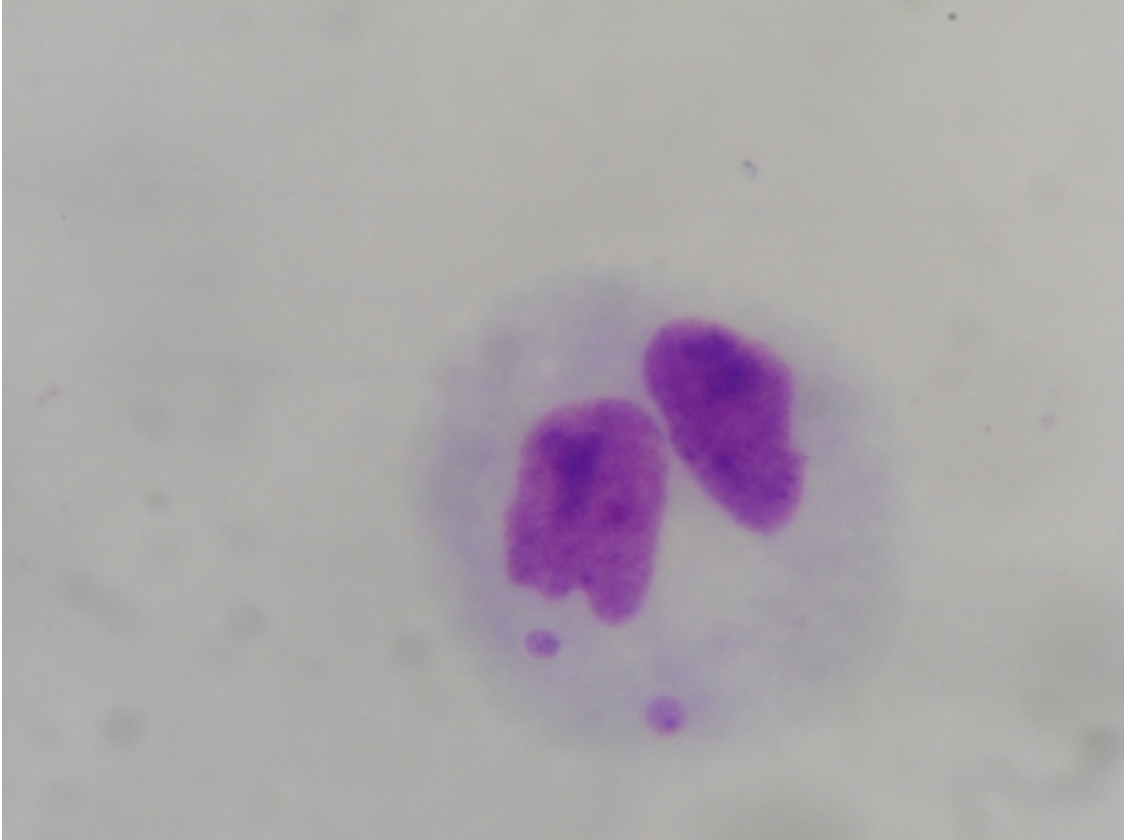
Çizelge 4.18. Bifentrin uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'lü		
DMSO	%2	4000	33	-	-	0,83±0,65	1,54±0,17
EMS	10mM	4000	142	22	13	5,63±1,60*	1,29±0,25*
Bifentrin (ppm)	50	4000	38	3	-	1,10±0,73	1,55±0,13
	100	4000	51	4	-	1,48±0,85*	1,46±0,21
	250	4000	66	4	-	1,85±0,44*	1,38±0,20*
	500	4000	71	4	1	2,05±0,68*	1,25±0,18*

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

4.4.3. Permetrin insektisitine ait MN bulguları

İnsan periferik lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 250 ve 500 ppm) PER uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri sırasıyla $0,95\pm0,70$; $1,25\pm0,75$; $1,63\pm0,52$ ve $1,85\pm0,68$ iken, bu oranın negatif kontrol grubu olan DMSO için $0,83\pm0,65$ olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). PER uygulama gruplarına ait binükleuslu hücrelerdeki MN sayıları incelendiğinde, en fazla MN en yüksek uygulama grubunda gözlenmiştir. Ayrıca uygulama gruplarında üçlü MN sadece en yüksek konsantrasyon olan 500 ppm PER’de görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Permetrin insektisitine ait üçlü mikronükleus

PER uygulama grupları için NBİ’de hesaplanmıştır. Tüm uygulama gruplarına ait NBİ değerleri sırasıyla $1,50\pm0,09$; $1,44\pm0,15$; $1,36\pm0,18$ ve $1,28\pm0,22$ ’dir. Sonuçlar

incelendiğinde konsantrasyon arttıkça nükleer bölünmenin azalarak sitotoksik etki gözlemlendiği belirlenmiştir. Ancak NBİ bakımından DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, sadece 250 ve 500 ppm’de sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) bulunmuştur.

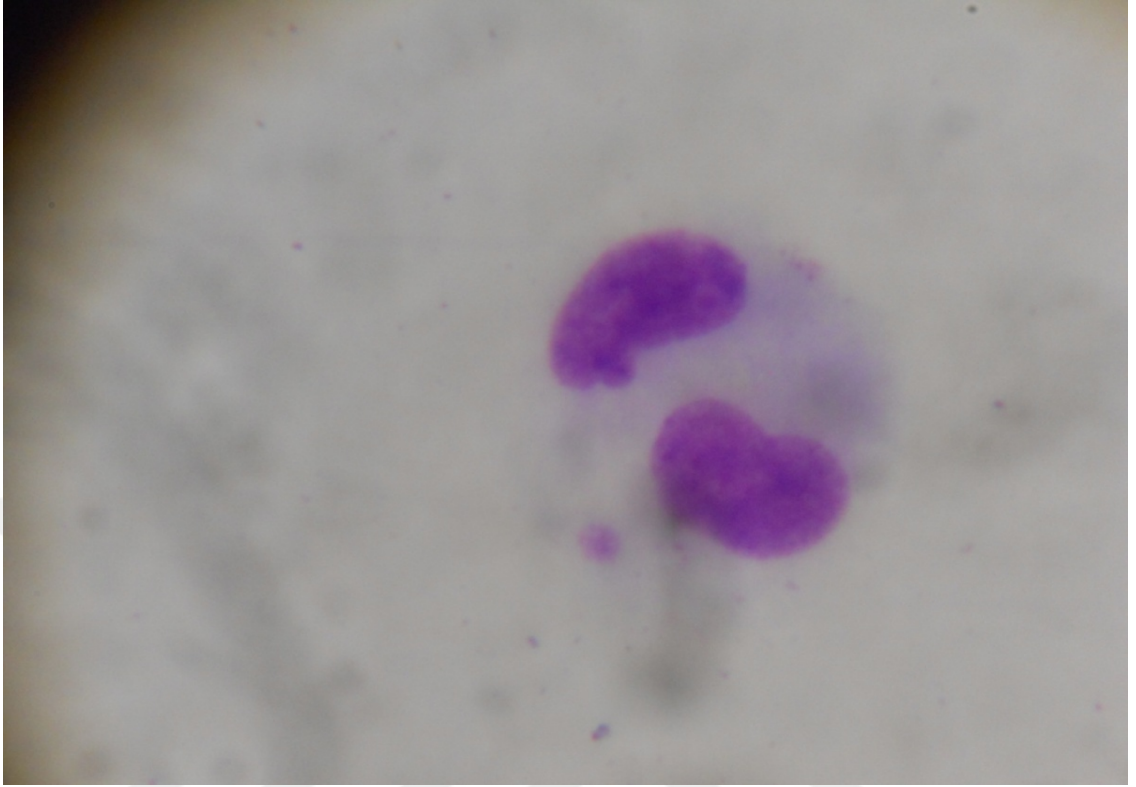
Çizelge 4.19. Permetrin uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1’li	2’li	3’lü		
DMSO	%2	4000	33	-	-	0,83±0,65	1,54±0,17
EMS	10mM	4000	142	22	13	5,63±1,60*	1,29±0,25*
Permetrin (ppm)	50	4000	36	1	-	0,95±0,70	1,50±0,09
	100	4000	46	2	-	1,25±0,75*	1,44±0,15
	250	4000	57	4	-	1,63±0,52*	1,36±0,18*
	500	4000	65	3	1	1,85±0,68*	1,28±0,22*

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO’ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

4.4.4. İmidakloprid insektisitine ait MN bulguları

Literatür bilgisi ve ön denemelerle belirlenen 50, 100, 250 ve 500 ppm İMİ uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri sırasıyla 0,95±0,80; 1,33±0,78; 1,70±0,56 ve 1,90±0,66’dır (Çizelge 4.20). Binükleuslu hücrelerdeki mikronükleus sayıları incelendiğinde, en fazla mikronükleus en yüksek uygulama grubu olan 500 ppm’de gözlenmiştir (65 tekli, 4 ikili, 1 üçlü). Ayrıca üçlü mikronükleus yalnızca 500 ppm’de tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İmidakloprid insektisitine ait üçlü mikronükleus

Çizelge 4.20. İmidakloprid uygulama gruplarına ait toplam MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları

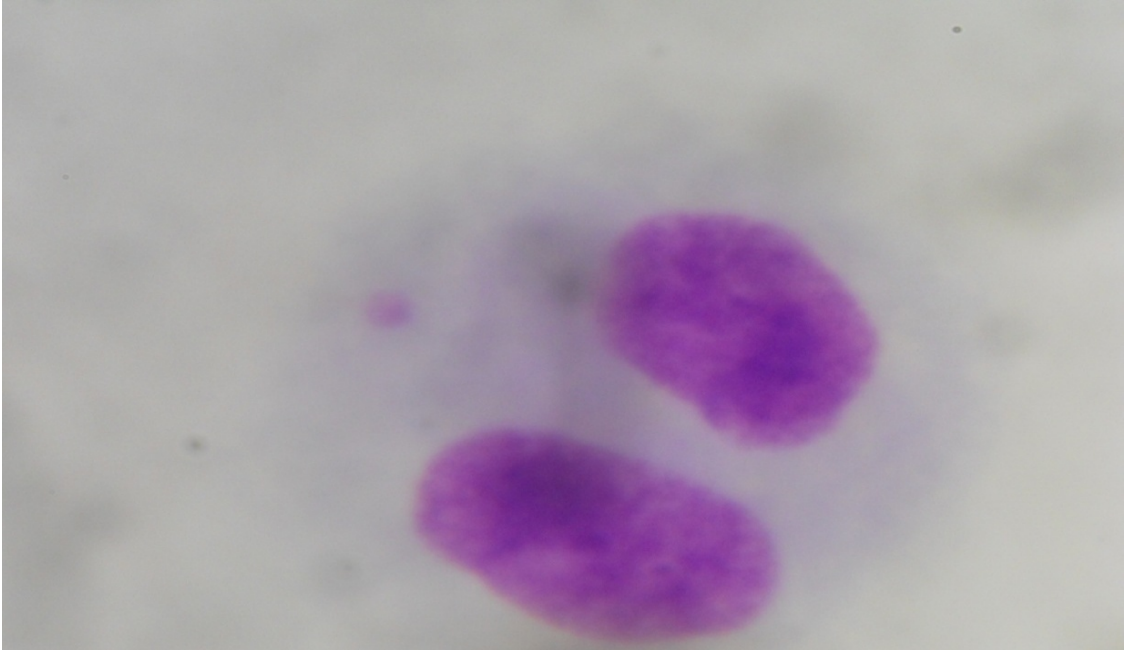
Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1	2	3		
DMSO	%2	4000	33	-	-	0,83±0,65	1,54±0,17
EMS	10mM	4000	142	22	13	5,63±1,60*	1,29±0,25*
İmidakloprid (ppm)	50	4000	36	1	-	0,95±0,80	1,54±0,23
	100	4000	49	2	-	1,33±0,78*	1,50±0,20
	250	4000	60	4	-	1,70±0,56*	1,37±0,30*
	500	4000	65	4	1	1,90±0,66*	1,28±0,28*

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

İMİ uygulama grupları için NBİ hesaplandığında ise bu değerler sırasıyla $1,54\pm 0,23$; $1,50\pm 0,20$; $1,37\pm 0,30$ ve $1,28\pm 0,28$ 'dir. Sonuçlar incelendiğinde konsantrasyon arttıkça nükleer bölünmenin azaldığı ve sitotoksik etkinin meydana geldiği belirlenmiştir. Ancak DMSO kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece en yüksek iki konsantrasyonda (250, 500 ppm) sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) bulunurken, bunun altındaki uygulama dozlarında (50, 100 ppm) sonuçlar $P>0,05$ düzeyinde önemsizdir.

4.4.5. Asetamiprid insektisitine ait MN bulguları

25, 50, 100 ve 250 ppm ASE uygulaması sonucu elde edilen insan periferik lenfosit hücrelerindeki MN yüzdeleri sırasıyla $0,95\pm 0,70$; $1,15\pm 0,73$; $1,48\pm 0,54$ ve $1,78\pm 0,78$ 'dir (Çizelge 4.21). ASE uygulama grubunda MN yüzdeleri DMSO ile karşılaştırıldığında 50, 100 ve 250 ppm lik ASE uygulamalarında sonuçlar istatistiksel olarak önemlidir ($P<0,05$). Mikronükleus sayıları incelendiğinde, en fazla mikronükleus ve üçlü mikronükleus 250 ppm uygulama grubunda gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Asetamiprid insektisitine ait üçlü mikronükleus

Ayrıca tüm insektisitler gibi ASE uygulama grupları içinde NBİ hesaplanmıştır. Uygulama gruplarına ait NBİ değerleri sırasıyla 1,54±0,24; 1,50±0,31; 1,28±0,25 ve 1,18±0,28'dir. Sonuçlar incelendiğinde konsantrasyon artışına bağlı olarak nükleer bölünmenin azaldığı ve sitotoksik etkinin meydana geldiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar DMSO negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise en yüksek iki konsantrasyonda (100 ve 250 ppm) sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu (P<0,05) bulunmuştur.

Çizelge 4.21. Asetamiprid uygulama gruplarına ait MN yüzdeleri, NBİ ve istatistiksel analiz sonuçları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdeleri	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1	2	3		
DMSO	%2	4000	33	-	-	0,83±0,65	1,54±0,17
EMS	10mM	4000	142	22	13	5,63±1,60*	1,29±0,25*
Asetamiprid (ppm)	25	4000	38	-	-	0,95±0,70	1,54±0,24
	50	4000	42	2	-	1,15±0,73*	1,50±0,31
	100	4000	51	4	-	1,48±0,54*	1,28±0,25*
	250	4000	58	5	1	1,78±0,78*	1,18±0,28*

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

Çalışmada kullanılan son genotoksisite testi olan MN, mitoz bölünme esnasında toksik ajanın etkisiyle tam kromozomların veya kromozom fragmentlerinin nükleus oluşurken dışarıda kalmasıyla karakterize edilir. Kullandığımız tüm insektisitlerde doz artışına paralel olarak MN yüzdeleri artmıştır. Uygulanan tüm insektisitler içerisinde en yüksek MN değerleri 71 tekli, 4 ikili, 1 üçlü olmak üzere 500 ppm BİF'de gözlenmiştir.

4.5. İnsektisit ve Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) Bitkisine ait Metanol Ekstraktının (PO_{met}) *İn Vivo* ve *İn Vitro* Testler için Birlikte Uygulaması

Çalışmada genotoksik etkileri belirlenen dört farklı insektisite karşı semizotu bitkisinin metanol ekstresi (PO_{met}) kullanılarak bu bitkinin antigenotoksik etkileri de gösterilmiştir. Bu amaçla her insektisitinin en yüksek uygulama gruplarına hem *in vivo* hemde *in vitro* testlerde PO_{met} uygulanarak antigenotoksik sonuçlar tespit edilmiştir.

4.5.1. İnsektisitlere PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları

Çalışmada SMART ile dört farklı insektisitinin sebep olduğu genotoksik etki tüm uygulama gruplarında gözlenmiştir. Ancak bu etki yalnızca en yüksek uygulama gruplarında 7 ppm BİF (Çizelge 4.3), 8 ppm PER (Çizelge 4.4), 2 ppm İMİ (Çizelge 4.5) ve 2 ppm ASE (Çizelge 4.6) istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bu nedenle PO_{met}'in antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için her insektisitinin en yüksek uygulama grubu ve %1 PO_{met} besiyerine birlikte ilave edilerek değerlendirilmiştir.

Uygulama sonucunda; *mwh/flr*³ kanat fenotipinde sadece insektisit içeren uygulama gruplarına göre, mutasyon sayıları tüm klon tiplerinde azalmıştır. Örneğin toplam klon frekansı, negatif kontrol grubu olan DMSO'da 0,13, enyüksek BİF, PER, İMİ ve ASE'de de sırasıyla 0,26, 0,31, 0,29 ve 0,30 iken, BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında sırasıyla 0,15; 0,15; 0,13 ve 0,14 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.22). İnsektisitlerle beraber PO_{met} uygulanan gruplarda, yalnız insektisit içeren gruplara göre sonuçlar istatistikî olarak pozitif etkiden negatif etkiliye gerilemiştir (P>0,05). *mwh/TM3* kanat fenotipinde ise toplam klon frekansı DMSO için 0,09, BİF için 0,14, PER için 0,14, İMİ için 0,13 ve ASE için 0,14 olarak bulunurken BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında sırasıyla 0,11, 0,09, 0,09 ve 0,11 olarak belirlenmiştir. İnsektisit+PO_{met} uygulanan gruplarda en yüksek insektisit uygulama gruplarına göre mutasyon frekanslarında düşüş olmuştur (P>0,05).

Ayrıca insektisitler ve insektisit+PO_{met} uygulama grupları için ayrı ayrı KİF değerleri de hesaplanmıştır. BİF, PER, İMİ ve ASE'nin *mwh/flr³* kanat fenotipindeki en yüksek uygulamalarında KİF değerleri sırasıyla 1,07, 1,28, 1,18 ve 1,23'dür. Bu değerler BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında ise 0,61, 0,61, 0,51 ve 0,56 olarak hesaplanmıştır.



Çizelge 4.22. İnsektisit+PO_{met} uygulamasından elde edilen SMART bulguları ve istatistiksel analizleri

Kontrol ve uygulama grupları	Kanat sayısı (N)	KTT klon (m = 2)			BTT klon (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Σ mwh klon (m = 2)			Σ klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
(mwh/flr³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		1	(0,01)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
7 BIF	80	21	(0,26)	+	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	21	(0,26)	+	21	(0,26)	i	1,07
7 BIF+PO _{met}	80	12	(0,15)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,61
8 PER	80	24	(0,30)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	25	(0,31)	+	25	(0,31)	+	1,28
8 PER+PO _{met}	80	12	(0,15)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,61
2 İMİ	80	22	(0,28)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	23	(0,29)	+	23	(0,29)	+	1,18
2 İMİ+PO _{met}	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2 ASE	80	23	(0,29)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	24	(0,30)	+	24	(0,30)	+	1,23
2 ASE+PO _{met}	80	11	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
(mwh/TM3) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i				7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	-	10	(0,13)	+	Dengeleyici			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
7 BIF	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	TM3			11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
7 BIF+PO _{met}	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	kromozomu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
8 PER	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	varlığında flr ³			11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
8 PER+PO _{met}	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	-	mutasyonu			7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
2 İMİ	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2 İMİ+PO _{met}	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	-				7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
2 ASE	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
2 ASE+PO _{met}	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, DMSO:dimetil sulfoksit; EMS: etil metansülfonat; BİF: Bifentrin; PER: Permetrin; İMİ: İmidakloprid; ASE: Asetamiprid; PO_{met}: *Portulaca oleracea* metanol ekstraktı; No: klon sayısı; Fr: frekans; D: istatistiksel sonuç; Frei and Würglar (1988)'e göre düzenlenmiştir; +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz; m:çarpım faktörü.

4.5.2. İnsektisit+PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen KKD bulguları

PO_{met}'in KKD üzerine etkisini gözlemek için dört farklı donörden alınan kanlarla hazırlanan periferik kan kültürlerine tüm insektisitlerin en yüksek dozu ile birlikte kendisi kadar PO_{met} (1:1/v:v) uygulaması sonucu elde edilen KKD frekansları ve Rİ değerleri Çizelge 4.23-4.24'de sunulmuştur. Ayrıca tüm insektisit gruplarının negatif kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistiksel veriler de aynı çizelgelerde belirtilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında insektisitlerin enyüksek uygulama gruplarındaki KKD/hücre; 500 ppm BİF için $7,05 \pm 0,02$, 500 ppm PER için $6,15 \pm 0,02$, 500 ppm İMİ için $7,12 \pm 0,01$ ve 250 ppm ASE için ise $6,73 \pm 0,01$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9-4.16). İnsektisit+PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen KKD/hücre oranları ise; BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için sırasıyla $3,80 \pm 0,01$; $3,83 \pm 0,04$; $3,88 \pm 0,04$ ve $3,86 \pm 0,05$ 'dir (Çizelge 4.23). İnsektisit+PO_{met} KKD/hücre oranları her insektisitinin en yüksek uygulama grubuyla karşılaştırıldığında, KKD/hücre oranlarındaki düşüş antigenotoksisite açısından önemlidir ($P < 0,05$).

Antigenotoksisite çalışması için insektisit+PO_{met} uygulama gruplarında Rİ'de hesaplanmış ve genel olarak bu değerler düşük bulunmuştur. Rİ, DMSO'da $2,24 \pm 0,07$, EMS'de $2,01 \pm 0,07$, en yüksek BİF, PER, İMİ ve ASE uygulamalarında sırasıyla $2,58 \pm 0,04$, $2,02 \pm 0,05$, $1,99 \pm 0,03$ ve $1,83 \pm 0,06$ iken, BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında ise sırasıyla $2,24 \pm 0,11$; $1,95 \pm 0,05$; $1,98 \pm 0,05$; $2,04 \pm 0,08$ 'dir (Çizelge 4.24). Rİ değerleri kontrol grubu olan DMSO'ya göre düşüş gösterecek sonuçlar istatistiksel olarak $P > 0,05$ düzeyinde önemsizdir.

Çizelge 4.23. İnsektisit+PO_{met} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri

Uygulama grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10
EMS (10mM)	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51
BİF 500 ppm	6,99	7,04	7,07	7,11	7,05±0,02*	4-13
BİF+PO _{met} (1:1)	3,76	3,80	3,83	3,81	3,80±0,01**	1-10
PER 500 ppm	6,19	6,14	6,17	6,11	6,15±0,02*	3-12
PER+PO _{met} (1:1)	3,80	3,88	3,82	3,84	3,83±0,04**	1-10
İMİ 500 ppm	7,14	7,13	7,10	7,11	7,12±0,01*	3-17
İMİ+PO _{met} (1:1)	3,88	3,86	3,86	3,92	3,88±0,04**	1-11
ASE 250 ppm	6,74	6,76	6,70	6,72	6,73±0,01*	3-14
ASE+PO _{met} (1:1)	3,82	3,84	3,92	3,86	3,86±0,05**	1-12

*DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli, **kendi insektisit grubuna göre önemli.

Çizelge 4.24. İnsektisit+PO_{met} uygulama gruplarına ait Rİ değerleri

Uygulama grupları	M1	M2	M3	Rİ
Distile su	60	116	224	2,41±0,03
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07
EMS (10mM)	81	140	178	2,01±0,07
BİF 500 ppm	84	240	76	2,58±0,04
BİF+PO _{met} (1:1)	120	130	172	2,24±0,11
PER 500 ppm	88	234	78	2,02±0,05
PER+PO _{met} (1:1)	98	122	146	1,95±0,05
İMİ 500 ppm	92	220	88	1,99±0,03
İMİ+PO _{met} (1:1)	112	100	160	1,98±0,05
ASE 250 ppm	140	188	72	1,83±0,06
ASE+PO _{met} (1:1)	168	141	122	2,04±0,08

4.5.3. İnsektisit+ PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen MN bulguları

PO_{met}'in antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için daha önceden MN testinde belirlenen BİF, PER, İMİ ve ASE insektisitlerinin en yüksek konsantrasyonlarına kendisi kadar PO_{met} (1:1/v:v) uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri ve NBİ verileri Çizelge

4.4'de sunulmuştur. En yüksek BİF, PER, İMİ ve ASE için MN yüzdeleri sırasıyla $2,05 \pm 0,68$, $1,75 \pm 0,75$, $1,90 \pm 0,66$ ve $1,78 \pm 0,78$ iken, insektisit+PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için sırasıyla $0,90 \pm 0,60$; $0,90 \pm 0,66$; $0,85 \pm 0,65$ ve $0,90 \pm 0,62$ 'dir. Bu oranların EMS'de $5,63 \pm 1,60$; negatif kontrol grubu olan distile su için $0,70 \pm 0,38$; DMSO için ise $0,83 \pm 0,65$ olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.25). İnektisit+PO_{met} uygulama grupları kendi insektisitlerinin en yüksek uygulamaları ile karşılaştırıldığında, PO_{met} P<0,05 düzeyinde iyileştirici etkili bulunmuştur. İnektisit+PO_{met} uygulama grupları için NBİ'de hesaplanmıştır (Çizelge 4.25). Tüm insektisit uygulama gruplarına ait NBİ değerleri, 500 ppm BİF için $1,25 \pm 0,18$, 500 ppm PER için $1,28 \pm 0,22$, 500 ppm İMİ için $1,28 \pm 0,28$ ve 250 ppm ASE için $1,18 \pm 0,28$ 'dir. Ancak BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için bu değerler sırasıyla $1,55 \pm 0,21$; $1,54 \pm 0,22$; $1,50 \pm 0,22$ ve $1,57 \pm 0,27$ olarak bulunmuştur. İnektisit+PO_{met} uygulama sonuçları kendi insektisit grupları ile karşılaştırıldığında, PO_{met} istatistiksel olarak bölünmeyi teşvik etmiştir. (P<0,05).

Çizelge 4.25. İnektisit+PO_{met} uygulama grupları için MN değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'lü		
Distile su	-	4000	28	-	-	$0,70 \pm 0,38$	$1,52 \pm 0,15$
DMSO	%2	4000	33	-	-	$0,83 \pm 0,65$	$1,54 \pm 0,17$
EMS	10mM	4000	142	22	13	$5,63 \pm 1,60^*$	$1,29 \pm 0,25^*$
BİF	500	4000	71	4	1	$2,05 \pm 0,68^*$	$1,25 \pm 0,18^*$
BİF+PO _{met}	500 + 500	4000	35	-	-	$0,90 \pm 0,60^{**}$	$1,55 \pm 0,21$
PER	500	4000	63	2	1	$1,75 \pm 0,75^*$	$1,28 \pm 0,22^*$
PER+PO _{met}	500 + 500	4000	36	-	-	$0,90 \pm 0,66^{**}$	$1,54 \pm 0,22$
İMİ	500	4000	65	4	1	$1,90 \pm 0,66^*$	$1,28 \pm 0,28^*$
İMİ+PO _{met}	500 + 500	4000	33	-	-	$0,85 \pm 0,65^{**}$	$1,50 \pm 0,22$
ASE	250	4000	58	5	1	$1,78 \pm 0,78^*$	$1,18 \pm 0,28^*$
ASE+PO _{met}	250 + 250	4000	34	-	-	$0,90 \pm 0,62^{**}$	$1,57 \pm 0,27$

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli, ** BİF, PER, İMİ ve ASE insektisit uygulama gruplarına göre 0,05 düzeyinde önemli.

4.6. İsektisit ve Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) Bitkisine ait Su Ekstraktının (PO_{su}) *İn Vivo* ve *İn Vitro* Testler İçin Birlikte Uygulaması

DeneYlerde kullanılan dört insektisit in *vivo* ve *in vitro* genotoksik etkileri belirlenmiş ve daha önceden hazırlanan Semizotu bitkisine ait su ekstraktı (PO_{su}) ile bu etkiler giderilmeye çalışılmıştır. PO_{su}'nun antigenotoksik etkisini belirlemek için SMART'da her insektisit in en yüksek dozuyla beraber PO_{su} (1:1/v:v) uygulanmıştır.

4.6.1. PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları

Çalışmanın ilk aşamasında insektisitlerin genotoksik etkileri belirlenerek her insektisit in en yüksek uygulama grubunda (7 ppm BİF, 8 ppm PER, 2 ppm İMİ ve 2 ppm ASE) sonuçlar istatistiksel olarak P<0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur (izelge 4.3-4.6). Bu çalışmanın ikinci aşaması olan semizotunun su ekstraktının antigenotoksitesinin belirlenmesi için ise (PO_{met}'de olduğu gibi) SMART'da en yüksek insektisit uygulamasıyla beraber besiyerine %1 oranında PO_{su} eklenmiştir. Uygulama sonucunda; yalnız insektisit içeren uygulama grubuna göre, her iki kanat tipinde de mutasyon sayıları tüm klon tiplerinde azalmıştır. Örneğin *mwh/flr³* kanat fenotipinde toplam klon frekansı, negatif kontrol grubu olan DMSO uygulamasında 0,13, enyüksek BİF, PER, İMİ ve ASE'de uygulamalarında sırasıyla 0,26, 0,31, 0,29 ve 0,30 iken, BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} uygulama gruplarında sırasıyla 0,14; 0,14; 0,13 ve 0,13 olarak gözlenmiş ve PO_{su} etkisiyle mutasyon frekansında düşüş gösterdiği belirlenmiştir (izelge 4.26). Sonuçlar insektisit+PO_{su} uygulamalarında, kendi insektisitine göre istatistikİ olarak pozitif etkiliden önemsiz etkiliye gerilemiştir (P>0,05).

mwh/TM3 kanat fenotipinde ise tüm insektisit uygulama gruplarında, bütün mutant klonlarda, istatistiksel olarak genotoksik etki gözlenmemiştir (P>0,05). şöyle ki; toplam klon frekansı DMSO için 0,09, BİF için 0,14, PER için 0,14, İMİ için 0,13 ve ASE için 0,14 olarak bulunurken BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} uygulama

gruplarında ise sırasıyla 0,11, 0,10, 0,09 ve 0,11 olarak belirlenmiştir. Tüm insektisitler için, insektisit+PO_{su} uygulamalarında gözlenen toplam klon frekanslarında ki düşüşe bağlı olarak PO_{su}'nun antigenotoksik etkili olduğunu söyleyebiliriz (P<0,05).

İnsektisitler ve insektisit+PO_{su} uygulama grupları için ayrı ayrı KİF değerleri hesaplandığında, *mwh/flr*³ kanat fenotipinde BİF, PER, İMİ ve ASE için sırasıyla 1,07, 1,28, 1,18 ve 1,23 olan bu değerler BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında 0,56, 0,56, 0,51 ve 0,51 olarak hesaplanmıştır.



Çizelge 4.26. İnsektisit+PO_{su} uygulamasında elde edilen SMART bulguları

Kontrol ve uygulama grupları	Kanat sayısı (N)	KTT klon (m = 2)			BTT klon (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Σ mwh klon (m = 2)			Σ klon (m = 2)			Klon induksiyon frekansı (KİF)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
(mwh/flr³) Normal kanat																	
Distile su	80	8	(0,10)		1	(0,01)		0	(0,00)		9	(0,11)		9	(0,11)		0,46
DMSO	80	9	(0,11)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
EMS	80	29	(0,36)	+	11	(0,14)	+	3	(0,04)	i	39	(0,49)	+	43	(0,54)	+	2,00
7 BIF	80	21	(0,26)	+	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	21	(0,26)	+	21	(0,26)	i	1,07
7 BIF+PO _{su}	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
8 PER	80	24	(0,30)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	25	(0,31)	+	25	(0,31)	+	1,28
8 PER+PO _{su}	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
2 İMİ	80	22	(0,28)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	23	(0,29)	+	23	(0,29)	+	1,18
2 İMİ+PO _{su}	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2 ASE	80	23	(0,29)	+	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	24	(0,30)	+	24	(0,30)	+	1,23
2 ASE+PO _{su}	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	0	(0,00)	-	10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
(mwh/TM3) Serrat kanat																	
Distile su	80	7	(0,09)		0	(0,00)					7	(0,09)		7	(0,09)		0,35
DMSO	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	i				7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
EMS	80	19	(0,24)	-	10	(0,13)	+	Dengeleyici			29	(0,36)	+	29	(0,36)	+	1,49
7 BIF	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	TM3			11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
7 BIF+PO _{su}	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-	kromozomu			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
8 PER	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-	varlığında flr ³			11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
8 PER+PO _{su}	80	8	(0,10)	i	0	(0,00)	-	mutasyon			8	(0,10)	i	8	(0,10)	i	0,41
2 İMİ	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	-	gözlenmez.			10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
2 İMİ+PO _{su}	80	7	(0,09)	i	0	(0,00)	-				7	(0,09)	i	7	(0,09)	i	0,35
2 ASE	80	11	(0,14)	i	0	(0,00)	-				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
2 ASE+PO _{su}	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	-				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, DMSO:dimethyl sulfoksit; EMS: etil metansülfonat; BIF: Bifentrin; PER: Permetrin; İMİ: İmidakloprid; ASE: Asetamiprid; PO_{su}: *Portulaca oleracea* su ekstraktı; No: klon sayısı; Fr: frekans; D: istatistiksel sonuç; Frei and Würzler (1988)'e göre düzenlenmiştir; +: pozitif; -: negatif; i: önemsiz; m:çarpım faktörü.

4.6.2. İnektisit+PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen KKD bulguları

Tüm inektisitlere PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen KKD/hücre oranı ve Rİ verileri Çizelge 4.27–4.28’de sunulmuştur. İnektisit+PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen KKD/hücre oranları BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 3,79±0,08; 3,80±0,06; 3,86±0,06 ve 3,81±0,04 iken bu oranlar en yüksek BİF, PER, İMİ ve ASE inektisit uygulama gruplarında 7,05±0,02, 6,15±0,02, 7,12±0,01 ve 6,73±0,01 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.27). İnektisit+PO_{su} sonuçlarının kendi inektisit gruplarıyla karşılaştırıldığında iyileştirici etkili olduğu belirlenmiştir (P<0,05).

İnektisit+PO_{su} uygulama grupları için Rİ’de hesaplanmış ve genel olarak bu değerler düşük bulunmuştur. Rİ, DMSO kontrol grubunda 2,24±0,07, en yüksek BİF, PER, İMİ ve ASE uygulamalarında sırasıyla 2,58±0,04, 2,02±0,05, 1,99±0,03 ve 1,83±0,06 iken, BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} uygulama gruplarında ise sırasıyla 1,96±0,05; 1,94±0,07; 1,95±0,05; 1,95±0,06’dır (Çizelge 4.28). İnektisit+PO_{su} uygulamaları kendi inektisit gruplarına göre düşüş göstermelerine rağmen sonuçlar istatistiksel olarak P>0,05 düzeyinde önemsizdir.

Çizelge 4.27. İnektisit+PO_{su} için KKD değerleri ve istatistiksel analizleri

Kontrol grupları	1. donör	2. donör	3. donör	4. donör	KKD/hücre (Ortalama)	Min.-Maks. KKD
Distile su	3,61	3,68	3,55	3,57	3,60±0,02	1-11
DMSO (%2)	3,76	3,60	3,72	3,72	3,70±0,01	1-10
EMS 10mM	32,25	31,85	33,56	32,78	32,61±0,01*	7-51
BİF 500 ppm	6,99	7,04	7,07	7,11	7,05±0,02*	4-13
BİF+PO _{su} (1:1)	3,78	3,76	3,80	3,82	3,79±0,08	1-10
PER 500 ppm	6,19	6,14	6,17	6,11	6,15±0,02*	3-12
PER+PO _{su} (1:1)	3,80	3,78	3,80	3,82	3,80±0,06	1-10
İMİ 500 ppm	7,14	7,13	7,10	7,11	7,12±0,01*	3-17
İMİ+PO _{su} (1:1)	3,88	3,86	3,86	3,82	3,86±0,06	1-11
ASE 250 ppm	6,74	6,76	6,70	6,72	6,73±0,01*	3-14
ASE+PO _{su} (1:1)	3,80	3,82	3,84	3,80	3,81±0,04	1-11

* DMSO’ya göre 0,05 düzeyinde önemli

Çizelge 4.28. İnsektisit+PO_{su} uygulama gruplarına ait Rİ değerleri

Kontrol grupları	M1	M2	M3	Rİ
Distile su	60	116	224	2,41±0,03
DMSO (%2)	62	126	194	2,24±0,07
EMS 10mM	81	140	178	2,01±0,07
BİF 500 ppm	84	240	76	2,58±0,04
BİF+ PO _{su} (1:1)	138	140	122	1,96±0,05
PER 500 ppm	88	234	78	2,02±0,05
PER + PO _{su} (1:1)	142	138	120	1,94±0,07
İMİ 500 ppm	92	220	88	1,99±0,03
İMİ+ PO _{su} (1:1)	140	140	120	1,95±0,05
ASE 250 ppm	140	188	72	1,83±0,06
ASE + PO _{su} (1:1)	140	138	122	1,95±0,06

4.6.3. İnsektisit+PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen MN bulguları

Dört farklı donörden alınan kanlarla hazırlanan periferik kan kültürlerine insektisitlerinin en yüksek konsantrasyonları ile beraber kendisi kadar PO_{su} (1:1 v:v) uygulanarak semizotu su ekstraktına ait antigenotoksisite çalışması sonucu elde edilen MN ve NBİ verileri Çizelge 4.29'da sunulmuştur. Genotoksisite belirlenirken elde edilen verilere göre en yüksek BİF, PER, İMİ ve ASE için MN yüzdeleri sırasıyla 2,05±0,68, 1,75±0,75, 1,90±0,66 ve 1,78±0,78 iken, semizotu su ekstraktının antigenotoksisitesinin belirlenmesi için insektisit+PO_{su} uygulaması sonucu elde edilen MN yüzdeleri BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 0,88±0,72; 0,88±0,72; 0,83±0,77 ve 0,85±0,69 olarak bulunmuştur. Bu oranların pozitif kontrol grubunda 5,63±1,60 negatif kontrol grubunda ise distile su için 0,70±0,38; DMSO için ise 0,83±0,65 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.29). İnsektisit+PO_{su} uygulamasında gözlenen MN yüzdelerindeki düşüş, PO_{su}'nun antigenotoksik etkili olduğunu göstermektedir (P<0,05).

İnsektisitlerin bölünme üzerine ket vurucu etkisinin giderilip giderilmediğinin belirlenmesi için her grupta NBİ hesaplanmıştır. En yüksek insektisit uygulama

gruplarına ait NBİ değerleri BİF için $1,25\pm 0,18$, PER için $1,28\pm 0,22$, İMİ için $1,28\pm 0,28$ ve ASE için $1,18\pm 0,28$ iken, insektisit+PO_{su} uygulama gruplarına ait NBİ değerleri BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla $1,56\pm 0,19$; $1,56\pm 0,18$; $1,52\pm 0,29$ ve $1,52\pm 0,40$ 'dır. Elde edilen bu değerler kendi insektisit gruplarıyla karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.29. İnsektisit+PO_{su} uygulama grupları için MN değerleri ve istatistiki analizleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon	İncelenen BNH Sayısı	BNH İçindeki MN			MN Yüzdesi	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ)
			1'li	2'li	3'ü		
Distile su	-	4000	28	-	-	$0,70\pm 0,38$	$1,52\pm 0,15$
DMSO	%2	4000	33	-	-	$0,83\pm 0,65$	$1,54\pm 0,17$
EMS	10mM	4000	142	22	13	$5,63\pm 1,60^*$	$1,29\pm 0,25^*$
BİF	500	4000	71	4	1	$2,05\pm 0,68^*$	$1,25\pm 0,18^*$
BİF+PO _{su}	500 + 500	4000	35	-	-	$0,88\pm 0,72$	$1,56\pm 0,19$
PER	500	4000	63	2	1	$1,75\pm 0,75^*$	$1,28\pm 0,22^*$
PER+PO _{su}	500 + 500	4000	35	-	-	$0,88\pm 0,72$	$1,56\pm 0,18$
İMİ	500	4000	65	4	1	$1,90\pm 0,66^*$	$1,28\pm 0,28^*$
İMİ+PO _{su}	500 + 500	4000	33	-	-	$0,83\pm 0,77$	$1,52\pm 0,29$
ASE	250	4000	58	5	1	$1,78\pm 0,78^*$	$1,18\pm 0,28^*$
ASE+PO _{su}	250 + 250	4000	34	-	-	$0,85\pm 0,69$	$1,52\pm 0,40$

BNH: binükleuslu hücre, * DMSO'ya göre 0,05 düzeyinde önemli.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarih boyunca, tarımsal savaşta kullanılan insektisitlere karşı, zararlılar direnç geliştirmişlerdir. Bu direnç, bitkisel kökenli, spesifik, yeni nesil sentetik insektisitlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Ancak sentetik insektisitler insan eliyle üretilen ekolojik zararlı kimyasallardır. Bunların potansiyel sinerjistik ve antagonist etkileri insanlarda tam olarak belirlenememiştir (Demsia *et al.* 2007). Ancak yeni üretilen bu sentetik insektisitlerin böceklerdeki ve memelilerdeki etki mekanizmaları benzerdir. Bu benzerliğin insan genomunda da mutasyonlara neden olabileceği yapılan son çalışmalar ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan insektisitler, son 30 yıl içinde ülkemizde ve dünyada sıklıkla kullanılan sentetik kimyasallardır. *Drosophila melanogaster* ile yapılan *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), *in vitro* ortamda ise insan lenfosit kültürüyle yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinden kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri günümüzde çeşitli mutajenlerin etkilerinin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da, Bifentrin (BİF), Permetrin (PER), İmidakloprid (İMİ) ve Asetamiprid (ASE) insektisitlerin olası genotoksik ve sitotoksik etkileri SMART, KKD, MN test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenen genotoksik ve sitotoksik etkiler semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin metanol (PO_{met}) ve su ekstraktları (PO_{su}) ile giderilmeye çalışılmıştır. Çalışmada insektisitlerden elde edilen veriler, tüm insektisitlerin ortak çözücüsü olan Dimetil sülfoksit (DMSO) ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca DMSO ve distile su da kendi aralarında karşılaştırılmış ve genotoksisite açısından fark olmadığı (P>0,05) istatistiksel olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2, 4.7, 4.8, 4.17).

Çalışmada kullanılan ilk genotoksisite testi olan SMART için LD₅₀ ve LD₁₀₀ değerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda insektisit içeren besi yerlerinde larvalar beslenmiş ve 24 saat içinde yaşayabilen/yaşayamayan bireyler kaydedilmiştir. Bu

sonuçlara göre, LD₅₀ değeri BİF ve PER için 5 ppm, İMİ için 1,5 ppm, ASE için de 1,6 ppm olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Kullanılan tüm insektisitlerin LD₅₀ değerlerine ait larval mortalite/hayatta kalış oranları, kontrol grubu olan DMSO ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak P<0,05 düzeyinde önemli bulunmuştur. Daha sonra tüm insektisitler için belirlenen LD₅₀ değerleri kullanılarak uygulama grupları oluşturulmuştur. LD₅₀ değeri, uygulama grupları için en yüksek doz kabul edilip daha düşük dozlarda da çalışılmıştır. Ancak SMART'da uygulama gruplarının hiçbirinde yeterli düzeyde mutant klon gözlenememiştir. Bu nedenle uygulama gruplarına ait doz aralıklarının belirlenebilmesi amacıyla, bir kez de LD₁₀₀ değerlerine kadar çalışılma genişletilmiştir. BİF, PER, İMİ ve ASE için LD₁₀₀ değerleri sırasıyla 10, 10, 3 ve 3,2 ppm olarak belirlenmiştir. Bu değer baz alınarak her insektisit grubu için dört farklı uygulama grubu oluşturulmuştur. Deneylerden elde edilen verilere göre, insektisitlerin *D. melanogaster* larvalarında yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstererek hayatta kalış oranlarını düşürdüğü ve belirli bir konsantrasyondan sonra mortaliteye sebep olduğu belirlenmiştir. Çalışmada insektisit uygulama gruplarından başka negatif ve pozitif uygulama grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol grubu olarak distile su ve insektisitlerin çözücüsü olan %1'lik DMSO, pozitif kontrol grubu olarak da mutajenik ve genotoksik etkisi iyi bilinen 1 ppm etil metansülfonat (EMS) kullanılmıştır.

Yapılan bu denemelere göre larvalar için hayatta kalış oranı negatif kontrol grupları olarak kullanılan distile su ve DMSO için %98, pozitif kontrol grubu olan EMS için de %87 olarak bulunurken, insektisit gruplarında bu değerler uygulama konsantrasyonlarına göre sırasıyla; 4, 5, 6, 7 ve 10 ppm BİF için %90, %49, %38, %20, %0; 5, 6, 7, 8 ve 10 ppm PER için %52, %41, %29, %13, %0; 0,5, 1, 1,5, 2 ve 3 ppm İMİ için %99, %80, %55, %19, %0; 0,5, 1, 1,6, 2 ve 3,2 ppm ASE için %94, %77, %51, %14,%0 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bu çalışmada kullanılan tüm insektisitler, konsantrasyon artışına paralel olarak *D.melanogaster*'in 3. evre larvalarının yaşam yüzdesini düşürmüştür. Hayatta kalma oranında gözlenen azalmaların insektisitlerin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sentetik insektisitlerin hepsi nörotoksik etkili olup, hedef

organizmaların sinir sistemleri üzerinde toksik etki gösterirler. Böceklerin merkezi ve periferik sinir sistemi, memeli sinir sistemi ile benzerlik gösterir. Bu nedenle insektisitlerin toksik etki mekanizmaları insanlarda da aynıdır. Ancak toksik etkinin şiddeti, maruz kalma süresi ve düzeyine, biyotransformasyon hızına ve absorpsiyon yoluna bağlıdır. İsektisitler, sinir hücrelerinde sodyum, potasyum ve klor iyonlarının membran geçişini engelleyerek (organik klorlular, piretroidler gibi), spesifik enzimleri inhibe ederek veya sinir uçlarındaki kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek (organik fosforlular, karbamatlar, neonikotinoidler gibi) nörotoksitesitelerini gösterirler (Vural 2005).

Piretroid insektisitler, memelilerde çok toksik olarak kabul edilmezler. İnsanda letal oral doz 70 kg ağırlığındaki bir insan için 50 g'dır. Ancak kapalı ortamlarda kullanılmaları durumunda insanlar üzerindeki toksik etkileri daha yüksektir (Vural 2005). Memelilerde bu insektisitlerin toksisitesinin düşük olmasının diğer nedenleri de, metabolizmalarının hızlı olması ve dermal absorpsiyonlarının az olmasıdır (Klaassen 2001; Bradberry *et al.* 2005). Piretroidler voltaj bağımlı sodyum kanallarının özelliklerini değiştirerek daha fazla açık kalmasına ve merkezi sinir sisteminin aşırı uyarılmasına neden olurlar. Yeni nesil piretroidler ise içerdikleri siyano grubuna bağlı olarak sodyum kanalları yanında beyindeki GABA çıkışlı klor kanallarının geçirgenliğini de değiştirirler. Böylelikle sinirler, kaslar ve salgı bezlerini etkileyerek daha ağır bir tablo oluştururlar. (Klaassen 2001; Bradberry *et al.* 2005). Piretroid ailesinden asefat, metomil ve permetrin gibi insektisitler ile yapılan toksisite çalışmasında yaprak biti olan *Myzus persicae*'nin ergin bireylerinde yaşam süreleri kısalmıştır (Hsieh and Allen 1986). Bu çalışmada kullanılan bifentrin ve permetrin gibi piretroid insektisitler de benzer nörotoksik mekanizmalarından dolayı, *D.melanogaster* larvalarında düşük konsantrasyonlarda da toksik etki göstermektedir. Piretroid insektisitlerden birisi olan sipermetrinin, *D.melanogaster*'in çeşitli gelişim evrelerinde toksisiteye neden olduğu bildirilirken (Karataş and Bahçeci 2008), Prasanthi and Rajini (2005) tarafından erkek farelerle yapılan bir çalışmada ise bir piretroid olan fenvaleratın oksidatif hasara neden olma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sinerjistik etkili olarak permetrin ve

diklorvos veya phoxim karışımı, bifentrin ve diklorvos veya phoxim karışımı, zebra balıklarında ayrı ayrı çok yüksek toksisite göstermektedirler (Zhi-Yong *et al.* 2009).

İkinci insektisit grubumuz içinde yer alan İMİ ve ASE neonikotinoidleri sistemik insektisitler olduğu için sadece etkili dozlarda hedef organizmaya özgüdürler. Neonikotinoidler, hem memeli hem de böceklerin post-sinaptik membranlarında bulunan nikotinic asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanarak agonist etki gösterirler (Tomizawa and Casida 2003, 2005). Memelilerdeki nikotinic asetilkolin reseptörü, böceklerdeki reseptörlere göre çok az yapısal değişiklik göstermektedir. Memelilerde sinir sistemine ait reseptörlerde bağlanma nAChR'nin $\alpha 4/\beta 2$ yüzeyinde olmaktadır ve muhtemelen böceklerde de buna benzer bir yüzey bulunmaktadır (Casida and Quistad 2004). nAChR'ler, böcekler ve memelilerin sinir sisteminde bulunan temel iyon uyarıcı reseptörlerdir. Memelilerde ayrıca sinir kas kavşağında sarkolemma üzerinde bol miktarda bulunurlar (Raymond-Delpech *et al.* 2005). Reseptörün hücre dışında uzun N-terminal bölümü yer alır ve uyarıcı özellikteki bir nörotransmitter olan ACh'nin bağlanma bölgesini oluşturur. Reseptöre ACh'nin bağlanmasıyla birlikte, nAChR'lerin merkezinde yer alan iyon kanalından, katyon iyon akışı gerçekleşir (Karlin 2002). Böylece sinaps sonrası sinir ve kas hücre zarı depolarize olurken aksiyon potansiyelinin oluşumu tetiklenmiş olur. nAChR, neonikotinoid insektisitlerin hedef bölgesidir. Bu insektisitler sinir sistemindeki nAChR'lere bağlanıp agonist etki ederek nöroeksitasyon (nöronun uyarılması) yaparlar (Scharf 2003). Neonikotinoidlerin ilk toksik belirtisi, nAChR'e üzerine gösterdikleri agonist etki ile ortaya çıkan nöroeksitasyon iken diğer bir etkisi ise uzun süren nöroinhibitör etkileridir (Watson 2001). Nöronal nAChR'lerin Ca^{+2} geçirgenliği oldukça fazladır. Ayrıca, nöronal nAChR'lerin aktivasyonu sonucu artan Ca^{+2} üretimi önemli hücre içi sinyaller oluşturabilir (Vernino *et al.* 1992; Dajas-Bailador and Wonnacott 2004). Rathouz *et al.* (1996), nikotinic agonistlerin nAChR'lere bağlanmasıyla voltaj-kapılı Ca^{+2} kanallarının aktive olduğunu ve bunun sonucunda hücre içi Ca^{+2} salgılanmasını arttığını bildirmişlerdir. Kullanılan neonikotinoid çeşidine, kullanılan canlı türüne ve etki ettiği dokuya göre neonikotinoidlerin etkileri canlıdan canlıya değişiklik göstermektedir (Dondero *et al.* 2010). Bu çalışmada kullanılan neonikotinoid insektisitlerden İMİ ve ASE'nin 0,5, 1, 1,5 ve 2 ppm konsantrasyonlarında, *D.melanogaster* larvalarına ait larval mortalite/hayatta kalış oranları yaklaşık olarak aynı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar

benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Şöyle ki; Arazi ve sera çalışmaları ile İMİ'nin bir mısır kurdu olan *Helicoverpa zea* üzerinde ovisidal etki gösterdiği (All *et al.* 2001), ASE'de ise bu etkinin az olduğu belirlenmiştir (Parrish *et al.* 2001). *Colpoclypeus florus* ve *Trichogramma platneri* ektoparazit böcekleri ile yapılan İMİ uygulamasında, topikal (deriye uygulanan) yüksek akut toksisite belirlenirken, bir günlük kısa maruziyette toksik olmadığı belirlenmiştir (Brunner *et al.* 2001). Kuru toprakta bulunan 0.2-0.5 mg/kg konsantrasyonundaki İMİ'ye maruz kalan *Eisenia fetida* (toprak solucanı)'da sperm anormalliği doz artışına bağlı olarak önemli derecede artmıştır (Zang *et al.* 2000). Kim *et al.* (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ASE'nin *Deraeocoris brevis* böceğinin erginleri üzerine akut, nimfleri üzerine ise orta derecede toksisite gösterdiği bildirilmiştir. Stapel *et al.* (2000) Amerika Birleşik Devletlerinde pamuk arazilerine düzenli aseptat ve İMİ uygulanmasından sonra pamuk nektarı üzerinden beslenmiş olan *Microplitis croceipes* dişilerinde ömür uzunluğunun kısaldığını ve insektisit uygulanmasından sonra 2-18 gün periyodunda parazitoidin konak arama yeteneğinin azaldığını gözlemişlerdir. Proenca *et al.* (2005) tarafından imidakloprid zehirlenmesi nedeni ile ölen insanlarda yapılan otopsilerde, insan dokularında likid kromatografi/kitle spektrofotometrisi ile örneklemeler yapılmış ve hemen tüm organ ve dokularda ilaç ve metaboliti saptanmıştır.

Çalışmada insektisitlerin toksik etki düzeyleri ve uygulama dozları belirlendikten sonra, *in vivo* ve *in vitro* genotoksisite testlerinin uygulamalarına geçilmiştir. Bu çalışmanın ilk genotoksisite testi olan SMART için tüm insektisit grupları DMSO kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışı ile paralel olarak toplam mutant klon frekanslarında artış gözlenmiştir. Fakat belirlenen bu artışlar sadece en yüksek uygulama gruplarında, normal kanat fenotipinde (*mwh/flr³*), istatistiksel olarak pozitif (+) etkili bulunmuştur (P<0,05). DMSO negatif kontrol grubunda 0,13 olan toplam klon frekansı, 7 ppm BİF'de 0,26'ya, 8 ppm PER'de 0,31'e, 2 ppm İMİ'de 0,29'a ve 2 ppm ASE'de ise 0,30'a yükselmiştir (Çizelge 4.3–4.6). İkinci genotoksisite test tekniği olan KKD'de ise, insektisitlere ait tüm uygulama gruplarında, DMSO kontrol grubuna göre ortalama KKD'ler artış göstermiş ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). Bu değerler DMSO'da 3,70 iken, BİF için sırasıyla 4,13, 4,62, 6,50 ve 7,05,

PER için sırasıyla 3,97, 4,56, 5,82 ve 6,15, İMİ için sırasıyla 4,43, 4,68, 5,92 ve 7,12 ve ASE için sırasıyla 3,92, 5,80, 6,14 ve 6,73 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9-4.16). Son genotoksik testimiz olan MN testinde ise tüm insektisit uygulama gruplarının en yüksek konsantrasyonunda gözlenen ortalama MN sayısı artarken, NBİ değerleri düşüş göstermiştir. DMSO'ya göre her iki değer değişikliği de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Elde edilen MN sayısı ve NBİ verileri sırasıyla DMSO'da 0,83 ve 1,54, 500 ppm BİF'de 2,05 ve 1,25; 500 ppm PER'de 1,85 ve 1,28; 500 ppm İMİ'de 1,90 ve 1,28; 250 ppm ASE'de ise 1,78 ve 1,18 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.18-4.21).

Tüm genotoksik testlerden elde edilen veriler literatürdeki benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Piretroid insektisitlerin, memelilerde toksik etkilerinin düşük olmasına rağmen, yapılan deneysel çalışmalarda ratlarda burun mukozası, akciğer, karaciğer, lenfoid dokular, timus gibi dokular üzerinde patolojik değişikliklere neden olduğu; yine kanda oksidatif stresi işaret eden enzim düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır (Doğruman vd 2000; Ünal vd 2009). Sankar *et al.* (2010)'un piretroid insektisitlerden sipermetrinle yaptıkları MN testinde de rat kemik iliği hücrelerinde bazı kromozomların tamamı veya fragmentlerinin çekirdek bölünmesi sonrası çekirdek dışında kalarak MN'leri oluşturduğu belirlenmiştir. Kocaman ve Topaktas (2010) sipermetrinin, insan periferik lenfositlerinde MN, KKD ve kromozomal aberasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Berköz vd (2010), piretroid insektisit deltametrinin ise albino Wistar sıçanlarında lipid peroksidasyonunu indüklediğini göstermiştir. Yine bir piretroid olan fastak ile yapılan bir çalışmada, *Odontophrynus cordobae* ve *Rhinella arenarum* kurbağa iribaşlarının eritrositlerinde, klastojenik etki ile mitotik sürecin bozulduğu tespit edilmiştir (Bosch *et al.* 2011). Bunun yanı sıra fastak nükleer hasarlara, reaktif oksijen ve azot türevlerinin hücre içinde birikimlerine de neden olmaktadır (Altuntas and Delibas 2002).

Fernandes *et al.* (2007) piretroidlerin eritrositlerde şekil bozuklukları, binükleuslu eritrositler gibi hücrede çeşitli morfolojik değişimlere neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu morfolojik değişimler mitokondrideki oksidatif strese kaynaklanmakta ve hücrede apoptotik değişimler gerçekleşmektedir. Böylece kromozom anomalileri ve anöploidi gibi nükleer hasarlar gözlenmektedir (Çavaş and Ergene-Gözükara 2005). Piretroidler sadece eritrositlerde değil, hepatositler, lenfositler ve diğer vücut hücrelerinde de DNA hasarlarına neden olurlar (Cortes- Gutierrez *et al.* 2011; Hussain *et al.* 2011). Shakoori *et al.* (1992)'un piretroidlerle yaptıkları çalışmada tavşanlarda günlük oral alımlarda lökositöz belirlemişlerdir. He *et al.* (1989) ise insanlarda piretroid zehirlenmelerinin %15'inde lökositöze rastlarken, Institoris *et al.* (1999) ve Matsushima *et al.* (2003) ratlarda piretroid uygulamalarında lökopeni de gözlemlemişlerdir.

Çalışmada kullanılan ikinci insektisit grubu olan neonikotinoidlerle yapılan benzer uygulamalar elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada da kullanılan ve neonikotinoid insektisit olan İMİ'nin toprak solucanında (*Eisenia fetida*) DNA hasarlarını önemli derecede arttırdığı ($P<0,01$) ve doz-etki ilişkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak *Vicia faba* (bakla)'da MN testinin sonuçları, İMİ'nin bazı konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak önemli farklılıklar oluşturmadığını da göstermiştir (Zang *et al.* 2000). İMİ uygulanmış *Rana limnocharis*'in ve *Rana n. hallowell*'in iribaşları için MN frekansı bakımından negatif kontrol ile uygulama grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Comet analizinde ise, İMİ uygulanan gruplarda eritrosit DNA hasarları, negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli derecede artış meydana getirmiştir (Feng *et al.* 2004). *In vitro* insan periferik kan lenfositlerinde de İMİ uygulaması sonucu MN ve KKD frekansında meydana gelen artış, negatif kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve yine comet analizinde de DNA hasarlarının dağılımı İMİ uygulanmış tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede farklılık göstermiştir (Feng *et al.* 2005). Lucero *et al.* (2000) İMİ'ye maruz kalan tarım işçilerinde MN oranının arttığını belirlemişlerdir. ASE ise insan periferik lenfosit hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda MN ve

KKD frekansını, kontrole ve çözücü kontrole göre önemli derecede artırmış, mitoz bölünme indeksini de düşmüştür (Yavuz Kocaman 2007). Yao *et al.* (2006) yine neonikotinoid olan ASE'nin üç bakteri türünde (*E. coli K12*, *Pse.FH2* ve *B. subtilis*) süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesini kısa bir süre için arttırdığını saptamışlardır.

Yapılan benzer çalışmalar ve elde ettiğimiz verilere göre BİF, PER, İMİ ve ASE yüksek dozlarda genotoksik etki göstermektedir. Bu genotoksik etkinin oluşum mekanizması ise şöyledir; insektisitlerin oluşturduğu sinir ve endokrin sinyallerdeki kesintiler, hücre içinde Ca^{+2} değişimine neden olmuştur. Böylece oksidatif strese neden olan nitrik oksit sentaz gibi proteolitik enzimlerin aktivasyonuna ve serbest radikallerin üretilmesinde artışa yol açmaktadır (Kaymak vd 2014). Sitoplazmada artan Ca^{+2} , inaktif durumdaki Ca^{+2} bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarının oluşmasına neden olmakta ve 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılmalar oluşmaktadır (Berliocchi *et al.* 2005). Hücre içerisinde ise insektisitler gibi toksik maddeler hücrenel bileşenlerin elektron alma/verme gibi redoks döngülerine (geri dönüşümlü oksidasyon yoluyla) girerek Reaktif Oksijen Türlerinin (Reactive Oxygene Species/ROS) seviyesini arttırabilirler. Hücre metabolizmasında glutatyon gibi indirgeyicilerin rezervlerini tüketebilir ve sonuçta antioksidan potansiyelini azaltabilirler. Antioksidan ve azalmış antioksidan potansiyeline yol açan enzimleri aktive edebilirler. Enerji sağlayan süreçlere müdahale ederek detoksifikasyon ve metabolizma için gerekli kaynakları azaltabilirler ve temel yaşamsal süreçlerdeki değişimler (transkripsiyon ve translasyon gibi) dolaylı yoldan ROS düzeyini arttırabilir (Stara *et al.* 2013). Ayrıca insektisitler, serbest radikal oluşturmakta ve ROS temizleyen enzimlerin yapısında da değişiklik meydana getirerek oksidatif stres oluşmasına sebep olmaktadır (Dettbarn *et al.* 2006; Giordano *et al.* 2007). Hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROS'lar ise biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonu ve DNA hasarına neden olabilirler (Banerjee *et al.* 2001). Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasına yol açar. Bu süreç sonucunda oluşan zincirleme reaksiyonlar ile hücrenin organelleri içerisinde bulunan

doymamış yağ asitleri, çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler de hasar görürler (Ikeda and Long 1990; Schmidley 1990; Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002). Lipid peroksidasyonu sonucunda ise son ürün olarak malonildialdehid (MDA) meydana gelir. MDA hücre zarından kolayca geçer ve hücre içinde Schiff bazlarıyla birleşerek, lipofuksin şeklinde sitoplazma içinde toplanır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar ile lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın da genotoksik ve mutajenik etkileri olduğunu ortaya koymuştur (Schmidley 1990).

Deneyleerde kullanılan tüm insektisitlerin genotoksisitesi tespit edilmiş ve genotoksik mekanizmalarının oksidatif strese dayalı olduğu literatür bilgileri ile de desteklenerek belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşaması olan antigenotoksisite için yüksek antioksidan değerlere sahip olduğu bilinen semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin metanol (PO_{met}) ve su ekstraktları (PO_{su}) kullanılarak *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenen genotoksik etkiler giderilmeye çalışılmıştır.

Antigenotoksisite çalışmalarında SMART için tüm insektisitlerin en yüksek uygulama konsantrasyonu ile birlikte besiyerine %1 oranında PO_{met} ve %1 oranında PO_{su} ayrı ayrı eklenmiştir. Uygulama sonucunda; yalnız insektisit içeren uygulama grubuna göre, her iki kanat tipindeki mutasyon frekansları ve tüm mutant klonlarda azalma gözlenmiştir. Örneğin toplam klon frekansı, en yüksek insektisit uygulama gruplarında 7 ppm BİF'de 0,26, 8 ppm PER'de 0,31, 2 ppm İMİ'de 0,29 ve 2 ppm ASE'de ise 0,30 iken, BİF+ PO_{met} ; PER+ PO_{met} ; İMİ+ PO_{met} ve ASE+ PO_{met} uygulama gruplarında sırasıyla 0,15; 0,15; 0,13 ve 0,14 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22). BİF+ PO_{su} ; PER+ PO_{su} ; İMİ+ PO_{su} ve ASE+ PO_{su} uygulama gruplarında ise bu değerler 0,14, 0,14, 0,13 ve 0,13 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.26). Sonuçlar istatistikî olarak pozitif etkiliden negatif etkiliye gerilemiştir ($P>0,05$).

In vitro olarak yapılan KKD ve MN çalışmalarında ise insektisitlerin en yüksek uygulama konsantrasyonlarına kendisi kadar PO_{met} ve PO_{su} ayrı ayrı eklenmiş ve hem PO_{met} hemde PO_{su} 'ya bağlı olarak KKD ve MN oranlarının düştüğü gözlenmiştir. Örneğin insektisitlerin en yüksek uygulama grubunda KKD'ler BİF, PER, İMİ ve ASE

için sırasıyla 7,05, 6,15, 7,12 ve 6,73 iken BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} uygulama gruplarında sırasıyla 2,24, 1,95, 1,98 ve 2,04 olarak bulunmuştur. BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} uygulama gruplarında ise bu değerler sırasıyla 1,96, 1,94, 1,95 ve 1,95 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.23, 24, 27 ve 28). KKD'de her iki semizotu ekstraktı uygulamasında da sonuçlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,05). MN çalışmasında ise bu değerler en yüksek insektisit uygulama gruplarında BİF için 2,05; PER için 1,75; İMİ için 1,90 ve ASE için 1,78'dir. İnsektisit+PO_{met} uygulaması sonucu elde edilen ortalama MN'ler ise BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için sırasıyla 0,90; 0,90; 0,85 ve 0,90 iken, BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 0,88, 0,88, 0,83 ve 0,85 olarak tespit edilmiştir (P>0,05). İnsektisit+PO_{su} uygulama grupları için NBI'de belirlenmiştir. Tüm uygulama gruplarına ait NBI değerleri BİF'de 1,25, PER'de 1,25, İMİ'de 1,28 ve ASE'de 1,18 olarak belirlenirken, BİF+PO_{met}; PER+PO_{met}; İMİ+PO_{met} ve ASE+PO_{met} için sırasıyla 1,55, 1,54, 1,50 ve 1,57, BİF+PO_{su}; PER+PO_{su}; İMİ+PO_{su} ve ASE+PO_{su} için sırasıyla 1,56, 1,56, 1,52 ve 1,52'dir (P>0,05) (Çizelge 4.25 ve 4.29).

Yukarıda da anlatıldığı gibi vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizliğe oksidatif stres denir. Oksidatif stres, membran akıcılığında değişikliğe, DNA hasarına ve karsinojenik etkiye sebep olmaktadır (Singh and Pandey 1989; Bagchi *et al.* 1995). Yapılan bu çalışmada da olduğu gibi insektisitlerin etkisiyle hücrede oksidan ve antioksidan arasındaki denge bozulduğunda serbest radikaller çoğalmakta, oksidatif strese ve DNA hasarlarına neden olmaktadır. DNA hasarı ve oksidatif stres, kanser, yaşlanma, telomer kısaltmaları, çeşitli hastalıklar ve patolojik durumlarda önemli rol oynamaktadır (Martin-Ruiz *et al.* 2004; Soltani *et al.* 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda pestisit zehirlenmelerinde üretilen serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun arttığı da bildirilmektedir (Oruç and Üner 2000; Hazarika *et al.* 2003).

Pestisitlerin neden olduğu oksidatif stres sonucu etkilenen en önemli sistemlerden biri de antioksidan sistemdir. Antioksidanlar hem dolaylı hem de dolaysız olarak

ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya serbest radikal türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Cheeseman and Slater 1993; Bagchi *et al.* 1995). Çalışmada SMART, KKD ve MN'de gösterildiği gibi insektisitlerin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı DNA hasarları, kromozom kırıklarına, mitozda tam kromozom veya kromozom fragmentleri kaybına, nokta mutasyonlara ve delesyonlara sebep olabilmektedir. Son otuz yılda yapılan birçok çalışma, bitkilerin antikanserojenik ve antimutajenik aktivitelerinin değerlendirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Çeşitli fitokimyasallar içeren meyve ve sebzeler, antioksidan, antimutajen ve antikanserojenik etki gösterebilirler (Arora *et al.* 2002). Bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerle yapılan çalışmaların birçoğu, oksidatif stresin neden olduğu genotoksisiteye karşı bitkisel bileşiklerin koruyucu bir aktivite sergilediğini göstermiştir (Plazar *et al.* 2008). Şifalı bitkiler, antioksidanlar ve ROS süpürücü moleküllerin potansiyel bir kaynağı olup (Arora *et al.* 2005), yüksek oranda ve çeşitlilikte vitamin ve mineral bulundurlar. Çeşitli araştırmacılar, bu şifalı bitkilerden birisi olan semizotunun hiçbir toksisite ve genotoksisite göstermediğini (Yen *et al.* 2001), vitaminler (A, B1, B2, B6, C, E, niasin, nikotinik asit, β karoten, riboflavin, α tokoferol, glutatyon vb.), mineraller (K, Ca, Fe, Mg, Na, P, Cu, Zn, Cl ve Mn) ve doymamış yağ asitleri, kalp krizini önlediği ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinen Omega-3 yağ asitleri, glutatyon, α -linoleik asit, glutamik asit ve aspartik asit bakımından zengin olduğunu bildirmişlerdir (Liu *et al.* 2000; Dweek 2001; Simopoulos 2004; Çoruh ve Ercişli 2011). Yine semizotu bitkisi izolösin, lösin, lisin, metiyonin, sistin, fenilalanin, tirozin, treonin ve valin gibi birçok amino asitten oluşan oldukça zengin bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Dkhil *et al.* 2011). Uddin *et al.* (2012)'e göre, farklı semizotu türleri içerdikleri mineral ve antioksidanlar ile fonksiyonel gıda ve besin destekleri (nutrasötikler) olarak da kullanılabilirler.

Önceki yıllarda yapılan antigenotoksisite çalışmalarında semizotunun güçlü bir radikal süpürücü kapasiteye sahip olduğu da belirlenmiştir. Örneğin Behravan *et al.* (2011) insan lenfosit hücrelerinde çeşitli oksidatif ajanların neden olduğu DNA hasarlarını,

semizotu su ekstraktı ile önemli ölçüde gidermişlerdir. Yen *et al.* (2001), insan lenfositlerinde kinolinin neden olduğu mutajeniteyi semizotu su ekstraktının giderdiğini bildirmişlerdir. Semizotu içerdiği askorbik asit ve glutasyon ile nükleik asitlerde ve DNA'da hasara neden olan peroksidazları ve serbest radikalleri süpürürken, yanı sıra bu radikallerin üretimlerini de azaltır (Folkes *et al.* 2011). Ayrıca You Guo *et al.* (2009), semizotunda bulunan polisakkaritlerin süperoksit anyonlarını, nitrik oksit ve hidroksil radikallerini önemli derecede süpürebildiklerini ve bu polisakkaritlerin T ve B lenfositlerinin çoğalmasını da arttırabildiklerini bildirmişlerdir. Dkhil *et al.* (2011) ratların karaciğer, böbrek ve testislerinde yaptıkları çalışmada ise semizotunun glutasyon, katalaz, süperoksit dismutaz, glutasyon redüktaz, glutasyon S transferaz, glutasyon perosidaz ve glutasyon düzeyini artırdığını ve yine bu çalışmada semizotunun MDA ve nitrit/nitrat oranını düşürerek antioksidan aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Benzer şekilde şifalı bitkiler kullanılarak *D.melanogaster*'de yapılan *in vivo* deneylerde *Echium amoenum* (İran borajı) metanol ekstraktının *D.melanogaster*'de EMS'nin genotoksik etkilerini azalttığı (Uysal *et al.* 2015), *R.canina* (kuşburnu)'nın DNA hasarına neden olan EMS üzerine süpürücü etki gösterdiği (Kızılet *et al.* 2013), *Panax ginseng* (Kore ginsengi)'in antirekombinojenik etkili olduğu (Pereira *et al.* 2008), *Salvia lavandulifolia* (adaçayı), *Hypericum scabrum* (binbirdelik otu), *Capsella bursa pastoris* (çoban çantası) ve *Teucrium orientale* (mayasıl otu) bitkilerinin su ekstraktlarının *D. melanogaster*'de İMİ ve ASE'nin ömür uzunluğunu kısaltıcı etkilerini giderdiği (Ünver 2015) gözlemlenmiştir ve bu çalışmalar bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

İnsan periferal lenfosit hücreleriyle daha önce yapılan antigenotoksisite çalışmaları da elde ettiğimiz sonuçlarımızla son derece uyumludur. Kasımoğlu and Uysal (2014), sipmetrin ve fenvelerat insektisitlerinin insan periferal lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksik etkinin *R. canina* (kuşburnu) su ve etanol ekstraktları ile Siddique *et al.* (2007), yine insan periferal lenfositlerinde sipratoren asetatin genotoksik etkisini *Ocimum sanctum* (fesleğen) bitkisi ile giderildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Gupta *et al.* (2009), anabolik steroidler olan trenbolon ve metiltestosteron tarafından insan periferal

lenfositlerinde uyarılan genotoksik hasarlara karşı *Camellia sinensis* (yeşil çay) ekstresinin antigenotoksik etkisini göstermişlerdir.

Benzer şekilde çeşitli canlılarda yapılan *in vivo* ve *in vitro* antigenotoksisite testleri de sonuçlarımızı desteklemektedir. Loizzo *et al.* (2007)'a göre, *Salvia officinalis* (bahçe adaçayı), *Laurus nobilis* (akdeniz defnesi) ve *Pistacia palestina* (filistin menengici) gibi bitki ekstraktları insanda tümör hücrelerinin gelişimini önlemektedir. *Hypericum* (kantaron otu) cinsine ait bitkiler ovaryum kanseri, mide kanseri, lenfosit tümörü ve çeşitli karsinomları etkili bir şekilde tedavi etmektedir (Duke 1985). Ramos *et al.* (2010) *Salvia* (adaçayı)'nın su ekstraktlarında bulunan rosmarinik asit ve luteolin-7-glukozidin, oksidatif ajanlara maruz bırakılmış olan organizmaları, oksidatif DNA hasarına karşı koruduğunu ve DNA onarımını uyardığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyada son otuz yılda sıklıkla kullanılan sentetik insektisitlerden BİF, PER, İMİ ve ASE'nin neden olduğu genotoksisite *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan insektisitler bitkisel kökenli sentetik insektisitler olup memelilerde düşük toksisite göstermektedirler. Ancak benzer çalışmalarda ve sonuçlarımızda da görüldüğü gibi yüksek dozlarda hücrede oksidatif strese ve buna bağlı olarak DNA hasarlarına neden olmaktadır. Çalışmanın ikinci kısmında ise *in vivo* ve *in vitro* testlerde insektisitlerin neden olduğu oksidatif stres kaynaklı DNA hasarları ve buna bağlı mutajenite, semizotu metanol (PO_{met}) ve su (PO_{su}) ekstraktlarıyla giderilmiştir. Semizotunun içerdiği zengin vitamin, mineral ve antioksidan maddelerin çok yüksek antioksidan, antigenotoksik ve antimutajenik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu etken maddeler, semizotu bitkisinin peroksidaz ve serbest radikalleri süpüren ve üretimlerini azaltan güçlü antioksidan bitkilerden olmasını sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abou-Donia, M.B., Goldstein, L.B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M. and Abdel-Rahman, A.A., 2008. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.*, 71 (2), 119-130.
- Adhikari, N. and Grover, I.S., 1988. Genotoxic effects of some systemic pesticide: in vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 12, 235-242.
- Aledo, R., Dutrillaux, B., Lombard, M. and Aurias, A., 1989. Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasms and two pre-tumoral lesions from xeroderma pigmentosum patients. *Int. J. Cancer*, 44, 79-83.
- All, J., Lance K. and Lohmeyer K., 2001. Ovicidal properties of leverage for bollworm in cotton. In *Proc. Beltwide Cotton Conf.*, Memphis, TN.
- Altun, D., Ayar, A., Uysal, H., Kara, A.A. and Ünal, E.L., 2010. Extended longevity of *Drosophila melanogaster* by water and ethanol extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Pharm. Biol.*, 48 (11), 1291-1296.
- Altuntas, I. and Delibas, N., 2002. Effects of organophosphate imedicide fenthion on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: the role of vitamins E and C. *Bio-Med. Res.*, 13, 43-47.
- Ames, B.N., Mc Cann, J. and Yamasaki, E., 1975. Models for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- Anderson, D., Dewdney R.S., Jenkinson P.C., Lovell D.P., Butherworth R. and Connign D.M., 1986. Sister chromatid exchange (SCE) analysis in 106 control individuals. *Progr. Clin. Biol. Res.*, 207, 39-58.
- Anonymous, 1990. World Health Organization. Permethrin Environmental Health Criteria 94. International Programme on Chemical Safety, Geneva, Switzerland.
- Anonymous, 2012. [http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life cycle.jpg](http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life%20cycle.jpg) (10.10.2012).
- Anonymous, 2013. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34435/title/>
- Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science-Bangalore* 82, 1227-1238.
- Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N. and Sharma, R.K., 2005. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother. Res.*, 19 (1), 1-22.
- Arslan, N. ve Yılmaz, G., 1993. Pestisit kirliliğinin azaltılmasında bitkisel bir kaynak pireotu (*Pyrethrum sp.*) türleri. *Ekoloji.*, 6, 3-6.
- Aşkın, H., Uysal, H. and Altun, D., 2007. Preventive role of folic acid on the developmental toxicity of phenol in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Ind. Health.*, 23, 591-598.
- Atamanalp, M. ve Cengiz, M., 2002. Bir sentetik piretroit insektisit (Cypermethrin)'in sublethal dozlarının *Capoeta capoeta capoeta* (Güldenstaedt, 1772)'da

- hemoglobin, hematokrit ve sediment seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. Ege. J. F. A. S., 19(1/2). 169 – 175.
- Athwal, R.S. and Sandhu, S.S., 1985. Use of human x mouse hybrid cell line to detect aneuploidy induced by environmental chemicals. Mutat. Res., 149, 73-81.
- Ayar, A., Uysal, H. and Altun, D., 2009. The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild *Vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera:Drosophilidae). Ekoloji, 19 (74), 38-44.
- Ayar, A., Uysal, H., Altun, D. and Aşkın, H., 2012. The effects of heat shock on the longevity in some strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). J. App. Biol. Sci., 6 (1), 51-55.
- Aydinoğlu, H., Dursun, H.Y. ve Bayraktar, K., 2002. Bitki Koruma Ürünleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A. and Stohs, S.J., 1995. *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology, 104 (1-3), 129-140.
- Banerjee, B.D., Seth, V. and Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. Rev. Environ. Health., 16, 1-40.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del Ry, S., Andreassi, M. G., Ballardini, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F. and Landi, S., 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. Environ. Mol. Mutagen., 31 (3), 228-242.
- Başaran, N., 2003. Tıbbi Genetik Ders Kitabı, Nobel&Güneş Tıp Kitap Evi, 465 s, Bursa.
- Baysal, V., Şahin, F., Erel, A., Oruk, S. and Menevşe, S., 2003. The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. J. Dermatol. Treat., 14, 22-25.
- Baytop, T., 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 520 s, İstanbul, Türkiye.
- Behravan, J., Mosafa, F., Soudmand, N., Taghiabadi, E., Razavi, B.M. and Karimi, G., 2011. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H₂O₂-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. J. Acupunct. Meridian. Stud., 4 (3), 193-197.
- Berköz, M., Yalın, S., Çömelekoğlu, Ü., Mazmancı, B., Mazmancı, M. A., Ünyayar, A. ve Eroğlu, P., 2010. Deltamethrinin beyinde oluşturduğu oksidatif hasarın önlenmesinde *Funalia trogili*’nin rolü. Mersin. Univ. Sağlık Bilim. Derg., 3(1), 1-8.
- Berliocchi, L., Bano, D. and Nicotera, P., 2005. Ca⁺² signals and death programmes in neurons. Phil. Trans. R. Soc. B., 360(1), 2255- 2258.
- Bernards, A. and Hariharan, I.K., 2001. Of flies and men studying human disease in *Drosophila*. Curr. Opin. Genet. Dev., 11 (3), 274-278.
- Bhattacharya, S., 2011. Natural antimutagens: A review. Res. J. Med. Plant., 5, 116-126.
- Bhunya, S.P. and Pati, P.C., 1990. Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. Mutagenesis., 5, 229-232.

- Bosch, B., Mañas, F., Gorla N. and Aiassa, D., 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *J. Toxicol. Environ. Health. Sci.*, 3, 155-163.
- Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T. and Vale, J.A., 2005. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.*, 24, 93-106.
- Brunet, J.L., Badiou, A. and Belzunces, L.P., 2005. *In vivo* metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci.*, 61 (8), 742-748.
- Brunner, J.F., Dunley, J.E., Doerr, M.D. and Beers, E.H., 2001. Effect of pesticides on *Colpoclypeus florus* (Hymenoptera: Eulophidae) and *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), parasitoids of leafrollers in Washington. *J. Econ. Entomol.*, 94, 1075-1084.
- Budak, F.A., 2005. The detection of genotoxic activity of the deltamethrin and permethrin by somatic mutation and recombination test with *Drosophila melanogaster*. *Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 87-93.
- Byrne, R. and McAndrews, J.H., 1975. Pre-Columbian puslane (*Portulaca oleracea* L.) in the New World. *Nature*, 253, 726-727.
- Çakır, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yıldırım, A. and Küfrevioğlu, O.I., 2006. Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium orientale* L. var. *orientale*. *Turk. J. Chem.*, 30, 483-494.
- Çakır, Ş. ve Sarıkaya, R., 2004. Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi üzerine etkisi. *G. Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24 (3), 71-80.
- Cantelli-Forti, G., Paolini, M. and Hrelia, P., 1993. Multiple end point procedure to evaluate risk from pesticides. *Environ. Health. Persp.*, 101(3), 15-20.
- Carrano A.V. and Natarajan A.T., 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.*, 204, 379-406.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B., 2004. Why insecticides are more toxic to insect than people: the unique toxicology of insects. *J. Pestic. Sci.*, 29, 81-86.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Perniconi, B., Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F.M., Marinaccio, A. and Iavicoli, S., 2005. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutat. Res.*, 587, 45-51.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S., 2005. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46, 64-70.
- Cheeseman K.H. and Slater T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull*, 49 (39), 479-480.
- Chen, C.J., Wang, W.Y., Wang, X.L., Dong, L.W., Yue, Y.T., Xin, H.L., Ling, C.Q. and Li, M., 2009. Anti-hypoxic activity of the ethanol extract from *Portulaca oleracea* in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 124, 246-250.
- Choy, W.N., 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, INC., 390 p, New York.
- Cicchetti, R., Bari, M. and Argentin, G., 1999. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with crest staining: an *in vivo* study in mice. *Mutat. Res.*, 439, 239-248.

- Clark, A.M. and Rockstein, M., 1964. Aging in Insects. 2nd ed. The Physiology of Insecta, Ed: Rockstein, M. Academic Press, Florida, 227-281.
- Clarke, M.L., Harvey, D.G. and Humphreys, D.J., 1981. Veterinary Toxicology, 2nd ed. Baillere Tindall, pp 404, London.
- Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández, J.L., López-Fernández, C., Gosálbez A. and Gosálvez, J. 2011. New application of the Comet Assay: Chromosome:Comet Assay. J. Histochem. Cytochem., 59, 655–660.
- Çoruh, İ. ve Ercişli, S., 2011. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.): tıbbi ve aromatik amaçla kullanılan yenilebilir yabancı bir bitki. An International Conference “Medicinal And Aromatic Plants In Generating Of New Values in 21 Century”, Sarajevo.
- Costa, J.F, Kiperstok, A.C., David, J.P., David, J.M., Giulietti, A.M., de Queiroz, L.P., dos Santos, R.R. and Soares, M.B., 2007. Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. Fitoterapia., 78, 510–514.
- Countryman, R.I. and Heddle J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. Mutat. Res., 41, 321-332.
- Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S., 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends. Pharmacol. Sci., 25 (6), 317-324.
- David, J., Cohet, Y. and Fovillet, P., 1975. The variability between individuals as a measure of senescence: A study of the number of eggs laid and the percentage of hatched eggs in the case of *Drosophila melanogaster*. Exp. Gerontol., 10, 17-25.
- De Waard, M. A., Georgopoulos, S.G., Hollaman, D.W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N.N. and Schwinin, F.J., 1993. Chemical control of plant diseases: Problem and prospects. Annu. Rev. Phytopathol., 31: 403-421.
- Delen, N., 2008. Fungisitler. Nobel Yayın No: 1360, 318 s, Ankara.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A., 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara.
- Demir, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B., 2008a. Protective effects of chlorophyll against the genotoxicity of UVB in *Drosophila* SMART assay. Fres. Environ. Bull., 17, 2180-2186.
- Demir, E., Kocaoğlu, S. and Kaya, B., 2008b. Protection against ultraviolet B-induced genotoxicity by the chlorophyllin in *Drosophila melanogaster*. Fres. Environ. Bull., 17, 2187-2192.
- Demir, E., Kocaoğlu, S., Çetin, H. and Kaya, B., 2009. Antigenotoxic effects of *Citrus aurantium* L. fruit peel oil on mutagenicity of two alkylating agents and two metals in the *Drosophila* wing spot test. Environ. Mol. Mut., 50, 483-488.
- Demircan, V. ve Yılmaz, H., 2005. Isparta ili elma üretiminde tarımsal ilaç kullanımının çevresel duyarlılık ve ekonomik açıdan analizi. Ekoloji., 57, 15-25.
- Demirel, S. ve Zamani, A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. Genel Tıp Dergisi, 12 (3), 123-127.
- Demsia, G., Vlastosa, D., Goumenoub, M. and Matthopoulos, D.P., 2007. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. Mutat. Res., 634, 32-39.

- Dettbarn, W.F., Milatovic, D. and Gupta, R.C., 2006. Oxidative Stress in Anticholinesterase-Induced Excitotoxicity. Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds, Ed: Gupta, R.C. Elsevier Academic Press, San Diego, 511– 532.
- Dkhil, M.A., Moniem, A.E.A., Al-Quraishy, S. and Saleh, R.A., 2011. Antioxidant effect of purslane (*Portulaca oleracea*) and its mechanism of action. J. Med. Plant. Res., 5 (9), 1589-1563.
- Doğruman, H., Cerit, H. ve Uzunören, N., 2000. Sıçanlarda esbiothrinin solunum yoluyla uygulanmasının bazı enzim düzeyleri üzerine etkileri. J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ, 26(2), 513-518.
- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F. and Viarengo, A., 2010. Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). Sci. Total. Environ., 408 (18), 3775-3786.
- Duke, J.A. 1985. Handbook of medicinal plants. CRC Press Inc, pp 552, Florida, US.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O. ve Canhilal, R. 2010. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları. VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.
- Dursun, O., Kosovaeri, M., Kaban, Ö., Dinçay, O. ve Kavak, H., 2013. Sera beyazsineği (*Trialeurades vaporariorum*, Westwood) üzerinde acetamiprid etken maddeli bazı preparatların etkisi. Türk. Entomol. Bült., 3 (2), 89-97.
- Dweck, A.C., 2001. Purslane (*Portulaca oleracea*)—the global panacea. Personal care magazine, 2 (4), 7-15. http://www.dweckdata.com/Published_papers/Portulaca
- Eastmond, D.A. and Balakrishnan, S., 2001. Genotoxicity of pesticides. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Krieger, R.I. Academic press, New York, 357-380.
- Emecen, G. ve Ünlü, H., 1995. Memelilerde pestisitlerin sitogenetik etkilerinin mikronükleus testi ile araştırılması. Turk. J. Biol., 19, 1-9.
- EPA, 2010. Environmental Protection Agency. Bifenthrin Summary Document. <http://www.regulations.gov/search/Regs/home.html> (07.09.2010).
- Eryiğit, T., Kumlay, A.M. ve Sancaktaroğlu, S., 2011. Semizotu (*Portulaca oleracea* L.) bitkisinin özellikleri ve kullanım alanları. In: I National Agriculture Conference and Exposition on Behalf of Ali Numan Kırac with International Participation Eskişehir, Turkey.
- Evans, H.J., 1976. Cytological Methods For Detecting Chemical Mutagens. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, Ed: Hollander A., Pleunum Press, New York, 1-29.
- EXTOXNET, 1996. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles - Bifenthrin. <http://extoxnet.orst.edu/pips/bifenthr.htm> (10.10.2015)
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The Comet assay: A comprehensive review, Mutat. Res. 339, 37-59.
- Falck, G., Catalan, J. and Norppa, H., 1997. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin-B. Mutat. Res., 392 (1-2), 71-79.
- Farnsworth, N.R., Akerev, O. and Bingel, A.S., 1985. The bulletin of WHO., 63: 9865-9871.

- Fenech, M. and Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147 (1-2), 29-36.
- Fenech, M., 1993. The cytochinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health. Persp.*, 101 (3), 101-107.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.*, 455 (1-2), 81-95.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P. and Zeng, E.Y., 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 61, 239-246.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L. and Peng, P., 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana n. hallowell*. *Chemosphere.*, 56 (5), 457-63.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo D.E.C. and Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88, 252-259.
- Folkes, L.K., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Radi, R. and Wardman, P., 2011. Kinetics of reduction of tyrosine phenoxyl radicals by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 506, 242-249.
- Fossen, M., 2006. Environmental Fate of Imidacloprid Revised by Matthew Fossen, Ph.D. Environmental Monitoring Department of Pesticide Regulation 1001 I Street Sacramento.
- Fred, H. and Timothy, J.B., 1997. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.*, 43(8), 779-788.
- Frei, H. and Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat. Res.*, 203, 297-308.
- Frei, H. and Würigler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis.*, 11 (4), 315-325.
- Ganguly, B.B., 1995. Age-related variation in sister chromatid exchanges and cell cycle kinetics in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals. *Mutat. Res.*, 316 (4), 147-56.
- Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K. and Stone, D., 2010. Imidacloprid technical fact sheet. National Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>. (12.03.2015).
- Giordano, G., Afsharinejad, Z., Guizzetti, M., Vitalone, A., Kavanagh, T.J. and Costa, L.G., 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 219, 181-189.
- Gomez-Arroyo, S., Noriega-Aldana, N., Juarez-Rodriguez, D. and Villalobos-Pietrini, R., 1987. Sister chromatid exchanges induced by the organophosphorus insecticides methyl parathion, dimethoate, phoxim and methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contam. Ambient.*, 8 (1), 63-70.
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., 1984. Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 6, 153-188.

- Graf, U. and Singer, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 8, 15-27.
- Graf, U. and Würigler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 219-226.
- Graf, U., Spano, M.A., Rincon, J.G., Abraham, S.K. and Andrade, H.H., 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African. News. Letter.*, 1, 9-13.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J. and Würigler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 402, 203-209.
- Greene, S.A. and Pohanish, R.P., 2005. *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, William Andrew, 1189p, Norwich, NY.
- Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 442-450.
- Güngör, B.Ö., 2003. Tarımsal kirlenme ve giderim yöntemleri. V. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Ankara.
- Gupta, J., Siddique, Y.H., Beg, T., Ara, G. and Afzal, M., 2009. Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes. *Biol. Med.*, 1 (2), 87-99.
- Guzman-Rincon, J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a Biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Ed: Butterworth, F.M., Corkum, L.D., Guzman-Rincon J., Plenum Press, New York, 169-181.
- Hasani, P., Yasa, N., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G. and Abdollahi, M., 2007. *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta. Pharm.*, 57, 123-129.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M. and Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology.*, 185, 1-8.
- He, F.S., Wang, S.G., Liu, L.H., Liu, L.H., Chen, S.Y., Zhang Z.X. and Sun, J.X., 1989. Clinical manifestation and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Arch. Toxicol.*, 63, 54-58.
- Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 133, 537-56.
- Hosseini, N. and Abolhassani, M., 2011. Immunomodulatory properties of borage (*Echium amoenum*) on BALB/c mice infected with leishmania major. *J. Clin. Immunol.*, 31, 465-471.
- Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, 277, 91-138.
- Hsieh, C.Y. and Allen, W.W., 1986. Effects of insecticides on emergence, survival, longevity and fecundity of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera:

- Aphidiidae) from mummified *Myzus persicae* (Homoptera:Aphididae). J. Econ. Entomol., 79, 1599-1602.
- Hunt, E.J., Lester, C.E., Lester, E.A. and Tackett, R.L., 2001. Effect of St. John's wort on free radical production. Life Sci. J., 69, 181-190.
- Hussain, R., Mahmood, F., Khan, M.Z., Khan A. and Muhammad, F., 2011. Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). Ecotoxicology., 20, 1-8.
- Idoamar, M., Hamms, R.E. and Alonsa, A.M., 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res., 513, 61-68.
- Ikedo, Y. and Long, D.M., 1990. The molecular basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurgery., 27, 1-11.
- Institoris, L., Undeger, U., Siroki, O., Nehez M. and Desi, I., 1999. Comparison of detection sensitivity of immuno- and genotoxicological effects of subacute cypermethrin and permethrin exposure in rats. Toxicology., 137, 47 – 55.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1990. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 98 Tetramethrin. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Jain, S., Shrivastava, S., Nayak, S. and Sumbhate, S., 2007. Recent trends in *Curcuma longa*. Pharmacogn. Rev., 1, 119-128.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. and Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. J. Agr. Food. Chem., 59, 2897-2908.
- Kagabu, S. and Akagi, T., 1997. Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds. J. Pestic. Sci., 22 (2), 84-89.
- Karataş, A. and Bahçeci, Z., 2008. Effects of cypermethrin on some development stages of *Drosophila melanogaster*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 82, 738-742.
- Karekar, V., Joshi, S. and Shinde, S.L., 2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res., 468, 183-194.
- Karimi, G., Khoei, A., Omid, A., Kalantari, M., Babaei, J., Taghiabadi, E. and Razavi, B.M., 2010. Protective effect of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* against cisplatin induced nephrotoxicity. Iran J. Basic. Med. Sci., 13 (2), 31-35.
- Karlin, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. Nat. Rev. Neurosci., 3 (2), 102-114.
- Kasımoğlu, C. and Uysal, H., 2014. Mutagenic biomonitoring of pirethroid insecticides in human lymphocyte cultures: Use of micronuclei as biomarkers and recovery by *Rosa canina* extracts of mutagenic effects. Pharmaceut. Biol., 53 (5), 625-629.
- Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat. Res., 9, 527-549.
- Kaya, B., Yanikoglu, A., Creus, A. and Marcos, R., 2000. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res., 16:465 (1-2), 77-84.
- Kaya, B., 2003. Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. T. J. Biol., 27, 241-246.

- Kaya, B., Markos, R., Yanıkoglu, A. and Creus, A., 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutat. Res.*, 557, 53-66.
- Kaymak, G., Akbulut, C., Esmer, H.E., Kayhan, F.E. ve Yön, N.D., 2014. Sucul organizmalarda çevresel şartlara karşı geliştirilen oksidatif stres mekanizmaları ve adaptif yanıtlar. *M.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 4, 154-169.
- Kelsey, K.T., Smith, T.J., Hammond, S.K., Letz, R. and Little, J.B., 1990. SCE in lymphocytes from styrene-exposed boat builders. *Mutat. Res.*, 241, 215-221.
- Kılıçgün, H., 2008. Kuşburnu İnfüzyonlarının Antioksidan Potansiyeli. Doktora tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kim, D.S., Brooks, D.J. and Riedl, H., 2006. Lethal and sublethal effects of abamectin, spinosad, methoxyfenozide and acetamiprid on the predaceous plant bug *Deraeocoris brevis* in the laboratory. *Biocontrol.*, 51 (4), 465-484.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.*, 392(1), 19-30.
- Kızılet, H. ve Uysal, H., 2012. Ergin *Drosophila*'nın ömür uzunluğunda kronik zeralenon alımına bağlı olarak toksisitenin uyarılması. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43 (1), 1-5.
- Kızılet, H., Kasımoğlu, C. and Uysal, H., 2013. Can the *Rosa canina* plant be used against alkylating agents as a radical scavenger? *Pol. J. Environ. Stud.*, 22, 1263-1267.
- Klaassen, C.D., 2001. *Toxicology, The basic science of poisons*. 1331 p, New York, USA.
- Kocaman, A.Y. and Topaktaş, M., 2010. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and α -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Toxicol.*, 25, 157-168.
- Kong, M.Z., Shi, X.H., Cao, Y.C. and Zhou, C.R., 2008. Solubility of imidacloprid in different solvents. *J. Chem. Eng. Data.*, 53 (3), 615-618.
- Kumlay, A.M., Yıldız, Ö., Yurt, B. and Zengin, H., 2010. Some wild edible plants consumed traditionally in Iğdır Türkiye. The 1 st International Symposium on Traditional Foods From Adriatic to Caucasus, Tekirdağ.
- Kuroda, K., Akao, M., Kanisawa, M. and Miyaki, K., 1976. Inhibitory effect of *Capsella bursa-pastoris* extract on growth of ehrlich solid tumor in mice. *Canc. Res.*, 36, 1900-1903.
- Kurvink, K., Bloomfield C.D. and Cervenka J., 1978. Sister chromatid exchange in patients with viral disease. *Exp. Cell. Res.*, 113 (2), 450-453.
- Latt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. and Wolff, S., 1981. Sister-chromatid exchanges: A report of the gene-tox program. *Mutat. Res.*, 57, 17-62.
- Lazutka, J.R., Dedonyte, V. and Lekevicius, R.K., 1992. SCE in lymphocytes of normal and alcoholic subjects. *Experientia.*, 48 (5), 508-12.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas.*, 24, 471-486.

- Lewis, E.B. and Bacher, F., 1968. Method of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros. Inf. Serv.*, 43, 193.
- Lim, Y.Y. and Quah, E.P.L. 2007. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chem.*, 103, 734–740.
- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, 1133 p, San Diego, USA.
- Liu, L., Howe, P., Zhou, Y.F., Xu, Z.Q., Hocart, C. and Zhan, R., 2000. Fatty acids and beta-carotene in australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *J. Chromatogr. A.*, 893 (1), 207-13.
- Liu, G.Y., Ju, X.L. and Cheng, J. 2010. Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modelling. *J. Mol. Model.*, 16, 993-1002.
- Ljubuncic, P., Dakwar, S., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H. and Bomzon, A., 2006. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vivo*. *Evid-Based Compl. Alternat. Med.*, 3, 329-338.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A. and Menichini, F., 2007. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer. Res.*, 27(5A), 3293-3299.
- Loveday, K.S. and Latt, S.A., 1978. Search for DNA interchange corresponding to sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic. Acids. Res.*, 5 (11), 4087-4104.
- Lucero, L., Pastor, S., Suárez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A. and Marcos, R., 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.*, 464, 255-262.
- Mac Gregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M. and Margolin, B. H., 1987. Guide lines for the conduct of micronucleus assay in bone marrow erythrocytes, *Mutat. Res.* 189, 103-112.
- Maffei, F., Forti, G.C., Castelli, E., Stefanini, G.F., Mattioli, S. and Hrelia, P., 2002. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 514 (1-2), 49-58.
- Martin-Ruiz, C., Saretzki, G., Petrie, J., Ladhoff, J., Jeyapalan, J., Wei, W., Sedivy, J. and Von Zglinicki, T., 2004. Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J. Biol. Chem.*, 279(17), 17826-17833.
- Matkowski, A., Zielinska, S., Oszmjanski, J. and Zarawska, E.L., 2008. Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim. and *S. verticillata* L. *Biores. Technol.*, 99 (16), 7892-7896.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M. and Sattelle, D.B., 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 22, 11, 573-580.
- Matsushima, Y., Uchida, O., Saitoh, M., Kawasaki, Y., Isama, K., Kaniwa, M., Inoue, T. and Kanno, J., 2003. Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, 2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) in rats. *Kokuritsu IyakuhiinShokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 121, 40 – 47.

- Mazmancı, B., Tamer, L. ve Aşkın, A., 2008. Sıçanlarda lambda-cyhalothrin'in akut toksik etkisinin araştırılması. Mersin. Univ. Sağlık. Bilim. Derg., 1 (1), 15-9.
- Meister, R.T., 1995. Farm chemicals handbook'95. Meister Publishing Company, pp 770, Willoughby, OH, USA.
- Meister, R.T., 1999 Farm chemicals handbook'99. Meister Publishing Company, pp 990, Willoughby, OH, USA.
- Mercan, U., 2007. Bioallethrinlerin sağlık üzerine olumsuz etkileri. Yyü. Vet. Fak. Derg., 18 (2), 73-78.
- Miller, T.A. and Salgado, V.L., 1985. The Mode of Action of Pyrethroids on Insects, Pyrethroid Insecticides. Taylor & Francis, ISBN: 0-85066-283-4.
- Mokrey, L.E. and Hoagland K.D., 1989. Acute toxicities of synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem., 9, 1045-1051.
- Müller, H. J., 1927. Artificial transmutation of the gene. Science. 66, 84-87.
- Mullins, J.W., 1993. Imidacloprid. A new nitroguanidine insecticide. ACS Symposium Series American Chemical Society, <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19940056309>.
- Munoz, E.R. and Barnett, B.M., 2002. The rodent carcinogens 1,4-dioxane and thiourea induce meiotic non-disjunction in *D. melanogaster* females. Mutat. Res., 517, 231-238.
- Natarajan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. Mutat. Res., 504 (1-2), 3-16.
- Nauen, R., 1995. Behaviour modifying effects of low systemic concentrations of imidacloprid on *Myzus persicae* with special reference to an antifeeding response. Pestic. Sci., 44 (2), 145-153.
- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S., 1988. The genotoxicity of N4-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test. Mutagenesis, 3 (1), 11-13.
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L.E., Lando, C., Merlo, F. and Bonassi, S., 2003. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. Mutat. Res., 544 (2-3), 243-254.
- oleracea.pdf (10.11.2015)
- Öncüer, C., ve Durmuşoğlu, E., 2008. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Ege Üniversitesi Yayını, Geliştirilmiş 6. Baskı, 220-302 s, İzmir.
- Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M.I. and Khalid, A., 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 91, 57-60.
- Oruç, E.Ö. and Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-d and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Orochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol., 127, 291-296.
- Osaba, L., Aguirre, A., Alonso, A. and Graf, U., 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res., 439 (1), 49-61.
- Osaba, L., Rey, M.J., Aguirre, A., Alonso, A. and Graf, U., 2002. Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. Mutat. Res., 518, 95-106.
- Öztaş, H., 2000. Hücre Biyolojisi (Sitoloji), Bakanlar Media, 275 s, Erzurum.

- Padmavathi, P., Prabhavathi, P.A. and Reddy, P.P., 2000. Frequencies of SCEs in peripheral blood lymphocytes of pesticide workers. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 155-160.
- Panovska, T.K., Kulevanova, S. and Stefova, M., 2005. *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium sp.* (Lamiaceae). *Acta Pharm.*, 55, 207-214.
- Parrish, M.D., Ayad, H. and Holmes, K., 2001. Ovicidal Activity of Acetamiprid (Assail™ brand 70WP insecticide) on Economic Pests of Cotton. In Proc. Beltwide Cotton Confederation, Memphis, TN.
- Peace, B.E. and Succop, P., 1999. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutat. Res.*, 425 (2), 225-230.
- Pelevina, I.I., Aleshchenko, A.V., Gotlib, V.I., Kudriashova, O.V., Semenova, L.P. and Serebrianyi, A.M., 2005. Effect of low dose irradiation on the reaction of blood lymphocytes of individuals with the somatic diseases. *Radiats. Biol. Radioecol.*, 45 (4), 412-415.
- Pereira, D.G., Antunes, L.M., Graf, U. and Spanó, M.A., 2008. Protection by *Panax ginseng* CA Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.*, 31 (4), 947-955.
- Perry, P.E. and Thomson, E.J., 1984. The Methodology of Sister Chromatid Exchanges. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd ed., Eds: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, 495-529.
- Perry, P.E. and Wolff, S., 1974. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature.*, 251 (5471), 156-158.
- Phillipson, J.D. and Anderson, L.A., 1989. *Ethnopharmacology and western medicine*. *J. Ethnopharmacol.*, 25(1), 61-72.
- Plazar, J., Filipic, M., and Groothuis, G.M., 2008. Antigenotoxic effect of xanthohumol in rat liver slices. *Toxicol. Vitro*, 22, 318-327.
- Prasanthi, K. and Rajini, P.S., 2005. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food. Chem. Toxicol.*, 43 (2), 299-306.
- Proenca, P., Teixeira, H., Castanheira, F., Pinheiro, J., Monsanto, P.V. and Marques, E.P. and Vieira, D.N., 2005. Two fatal intoxication cases with imidacloprid: LC/MS analysis. *For. Sci. International.*, 153, 75-80.
- Rahden-Staron, I., 2002. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases *in vitro* and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 518, 205-213.
- Rainaldi, G., Flori, L., Colella, C.M., Mariani, T., Piras, A., Sisim, S. and Simili, M., 1987. Analysis by BrdU-labelling technique of induced aneuploidy in mammalian cells in culture. *Mutat. Res.*, 177, 255-260.
- Ramirez-Victoria, P., Guzmán-Rincón, J., Espinosa-Aguirre, J.J. and Murillo-Romero, S., 2001. Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum spp.*) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat. Res.*, 496, 39-45.
- Ramos, A.A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C. and Collins, A.R., 2010. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J. Agr. Food Chem.*, 58 (12), 7465-7471.

- Rathouz, M.M., Vijayaraghavan, S. and Berg, D.K., 1996. Elevation of intracellular calcium levels in neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Neurobiol.*, 12 (2), 117-131.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J. and Sattelle, D.B., 2005. Ion channels: molecular target of neuroactive insecticides. *Invertebr. Neurosci.*, 5 (3-4), 119-33.
- Robert, L.M., 2002. Insect Control in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Wiley-VCH. [doi:10.1002/14356007.a14_263](https://doi.org/10.1002/14356007.a14_263)
- Rodriquez-Reyes, R. and Morales R.P., 2003. Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of SCE induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagenesis*, 18 (1), 65-72.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A. and Alonso-Moraga, Á., 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res.*, 585, 147-155.
- Rooney, D.E. and Czepulkowski B.H., 1986. Human cytogenetics: a practical approach. IRL Press Oxford, pp 224, England.
- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., 2005. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (boiss.) rech. f. from Iran. *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (10), 1892-1896.
- Sankar, P., Telang A.G., and Manimaran, A., 2010. Curcumin protects against cypermethrin-induced genotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 289–291.
- Sayılı, M. ve Akman, Z., 1994. Tarımsal uygulamalar ve çevreye olan etkileri. *Ekoloji*, 12, 28-32.
- Schaik, V.N. and Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressant in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. *Mutat. Res.*, 260, 99-104.
- Scharf, M.E., 2003. Neurological Effects of Insecticides. In: Pimental D Eds; *Encyclopedia of Pest Management*, Marcel-Dekker, 1-5 p, New York.
- Schmidley, J.W., 1990. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke.*, 21 (7), 1086- 90.
- Scollon, E.J., Starr, J.M., Godin, S.J., DeVito, M.J. and Hughes, M.F., 2009. *In vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug Metabol. Dispos.*, 37 (1), 221-228.
- Selby, P.B. and Olsen, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specificlocus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203, 297-308.
- Shakoori, A.R., Aslam F. and Sabir, M., 1992. Effect of prolonged administration of insecticide (cyhalothrin/karate) on the blood and liver of rabbits. *Folia. Biol.*, 40, 91–99.
- Siddique, Y., Ara, G., Beg, T. and Afzal, M., 2007. Anti-genotoxic effect of *Ocimum sanctum* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured mammalian cells. *Biol.*, 58, 4-7.
- Simopoulos, A.P., 2004. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biol.l Res.*, 37, 263-277.

- Sinclair, B.J. and Roberts, S.P., 2005. Acclimation, shock and hardening in the cold. *J. Therm. Biol.*, 30, 557-562.
- Singh, S.K. and Pandey, R.S., 1989. Toxicity of endosulfan on kidney of male rats in relation to drug metabolizing enzymes and microsomal lipid peroxidation. *Indian. J. Exp. Biol.*, 27, 725-728.
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghighi, F. and Behravan, J., 2009. Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell. Biol. Toxicol.*, 25, 291-296.
- Sönmez, S., 1992. Yenidoğan Hiperbilirubinemisinde Uygulanan Fototerapinin Kromozomlar Üzerine Etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sorensen, J.G. and Loeschcke, V., 2002. Decreased heat shock resistance and downregulation of hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.*, 16, 379-384.
- Soysal, Y., Şahin, F.İ. ve Menevşe, S., 2008. İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve β -karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine in vitro etkileri. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 15 (3), 23-29.
- Stapel, J.O., Cortesero, A.M. and Lewis, W.J., 2000. Disruptive sublethal effects of insecticides on biological control: Altered foraging ability and life span of a parasitoid after feeding on extrafloral nectar of cotton treated with systemic insecticides. *Biol. Contr.*, 17, 243-249.
- Stara, A., Kristan, J., Zuskova, E. and Velisek, J., 2013. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 105(1), 18-23.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalfin, J., Norppa, H. and Marcos R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 341, 169-184.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejia, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex-linked recessive lethal test. *Mutat. Res.*, 113, 117-133.
- Tang, D., Warburton D., Tannenbaum S.R., Skipper P.I, Santella R.M., Cereijido G.S., Crawford F.G. and Perera F.B., 1999. Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Canc. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 8 (5), 427-31.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 1991. Farmakognozi cilt 1. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları no:66, 347 s, Ankara.
- Tanrıverdi, N., 1991. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE). Tıpta Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tatar, A., Özkurt, Z., Hacımüftüoğlu, A., Yeşilyurt, A. and Vançelik, S. 2009. Evaluation of ribavirin genotoxicity with sister chromatid exchange and micronuclei assays in humans. *Turk. J. Med. Sci.*, 39, 241-6.
- Thierens, H., Vral, A. and De Ridder, L., 1996. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat. Res.*, 360 (2), 75-82.

- Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann, G. and Cunha, K.S., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 1-9.
- Tomizawa, M. and Yamamoto, I., 1993. Structure-activity relationships of nicotinoids and imidacloprid analogs. *J. Pesticide. Sci.*, 18 (1), 91-98.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 48, 64-339.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 68-247.
- Tomlin, C.D.S., 2006. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 14th ed. British crop production council. Alton, England, 813-814.
- Topaktaş, M. and Speit, G., 1990. Sister chromatid exchange (SCE) Testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık. Bil. Der.*, 5 (1,2,3), 73-84.
- Tripathy, N.K., Mishra, R.K., Anandkumar, A. and Sahu, G.P., 1994. Lack of genotoxicity of saccharin studied in the *Drosophila* wing spot and sex-linked recessive lethal tests. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 10, 89-98.
- Tucker, J.D., Auletta A., Micheal C.C., Kerry L.D., Kram D.J., Tice R.R. and Carrona A.V., 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutat. Res.*, 297 (2), 101-180.
- Tucker, J. and Preston, R.J., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.*, 365, 147-159.
- TÜİK; 2015. Türkiye istatistik kurumu resmi sitesi. <http://www.tuik.gov.tr> (02.07.2015).
- Tunçtürk, R., 2013. Fonksiyonel gıda olarak tüketilen semizotunun (*Portuleca oleracea* L.) tıbbi bitki olarak değerlendirilmesi. *Review. Journal.*, 6 (1), 101-103.
- Türkez, H., 2007. Bazı Bor Bileşiklerinin *İn Vitro* Şartlarda Periferik İnsan Kanı Üzerine Genetik ve Biyokimyasal Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Uddin, M.K., Juraimi, A.S., Ali, M.E. and Ismail, M.R., 2012. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(8), 10257–10267.
- Ünal, A., Koyuncu, M., Yıldız, L., Ünal, R., Şeşen, T. ve Tanyeri, Y., 2009. Türkiye Klinikleri. *Tıp Bilimleri Dergisi*, 29(6), 1517-1521.
- Ünlü, H. and Bozcuk, A.N., 1979. Genetics of longevity in *Drosophila* I: The Effects of w, m and f mutant genes in various genotype combinations. *Exp. Gerontol.*, 14, 117-124.
- Ünver, S., 2015. Bazı Neonikotinoid İsektisitlerin *Drosophila melanogaster*'de Ömür Uzunluğu ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri ve Olası Toksik Etkilerinin Çeşitli Bitki Ekstraktları Kullanılarak İyileştirilmesi Üzerine Araştırmalar. Y.Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Uysal, H., Altun, D., Askin, H. ve Aslan, A., 2008. *Drosophila melanogaster*'de *Usnea longissima* Ach. likeninin su ektresinin ömür uzunluğu üzerine etkisinin araştırılması. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.

- Uysal, H., Altun, D. ve Aslan, A., 2009. *Drosophila melanogaster*'de *Lobaria pulnaria* (L.) Hoffm. likeninin ömür uzunluğu üzerine etkisi. TÜBAV. Bilim., 2 (3), 271-276.
- Uysal, H., Kızılet H., Ayar, A. and Taheri, A., 2015. The use of endemic Iranian plant, *Echium amoenum* against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects. Toxicol. Ind. Health., 31 (1),44-51.
- Valadares, B.L.B., Graf, U. and Spano, M.A., 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food. Chem. Toxicol., 46, 1103-1110.
- Vernino, S., Amador, M., Luetje, C.W., Patrick, J. and Dani, J.A., 1992. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Neuron., 8 (1), 127-34.
- Vigfusson, N.V., Vyse, E.R., Pernsteiner, C.A. and Dawson, R.J., 1983. *In vivo* induction of sister-chromatid exchange in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, diazinon and guthion. Mutat. Res. 118 (1-2), 61-8.
- Vogel, E.W., 1992. Tests for recombinogens in somatic *Drosophila*. Mutat. Res., 284, 159-175.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73, 659 s, Ankara.
- Ware, G.W., 1980. Pesticides:Chemical Tools. Pesticides Theory and Application, New York, 3-15.
- Watson, G.B., 2001. Actions of insecticidal spinosyns on caminobutyric acid responses fi-om small-Jiameter cockroachneurons. Pestic. Biochem. Physiol., 71 (1), 208.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M. and Burt, J.P., 1992. SCS/ARS/CES Pesticides properties database for environmental decisionmaking. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 123, 1-157.
- Webb, L.J., 1948. Cited in: Watt, J.M. and Breyer, B.M.G. (Eds.), The Medical and Poisonous Plants of Southern and Eastern Europe, Africa, 1962, 2nd ed. Eyre & Spottiswoode, London, p. 869.
- Würgler, F.E. and Vogel, E.W., 1986. *In vivo* Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. Chemical Mutagens: Principle and Methodsfor their Detection, Ed: Serres, F.J. Plenum Press, New York, 1-72.
- Yao, X.H., Min, H. and Lv, Z.M., 2006. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. Biomed. Environ. Sci., 19, 309-314.
- Yavuz Kocaman, A., 2007. Acetamiprid ve Alpha-cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferel Lenfositlerindeki *In vitro* Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. and Peng, H.H., 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. Food Chem. Toxicol., 39, 1045-1053.
- Yıldız, M., Gürkan, M.O., Turgut, C. ve Kaya, Ü., 2005. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara.

- You Guo, C., Jia, S.Z. and Ping, C.X., 2009. Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.*, 45, 448–452.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology: web resources. *Toxicology*, 173, 103-121.
- Yücer, M.M., 2012. Ruhsatlı Tarım İlaçları. Hasad Yayıncılık, 11 s, İstanbul.
- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y. and Kong, Z.M., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.*, 108, 271-278.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44, 363-371.
- Zeliger, H.I., 2008. Human Toxicology of Chemical Mixtures: Toxic Consequence Beyond the Impact of One-component Product and Environmental Exposures, William Andrew, 400p, Norwich, NY.
- Zhi-Yong Z., Xiang-Yang Y., Dong-Lan W., Hai-Juan Y. and Xian-Jin L., 2009. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest. Manag. Sci.*, 66(1), 84-89.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M. and Costa, R., 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 322, 111-116.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adıyaman'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adıyaman'da tamamladı. 2000 yılında, Erzurum Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'ne girerek 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora Programına başladı. Evli ve bir çocuk babası olup 2009 yılından beri Sağlık Bakanlığı'na bağlı olarak çalışmaktadır.

