

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

SİGNUM PESTİSİDİ VE AKTİF MADDELERİNİN
***IN VITRO* ŞARTLARDA İNSAN PERİFERAL**
KAN LENFOSİTLERİ ÜZERİNE MİKRONUKLEUS
OLUŞTURMA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Akın ÇAYIR

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih:07/02/2011

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

ÇANAKKALE

DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

AKIN ÇAYIR tarafından PROF. DR. MAHMUT COŞKUN yönetiminde hazırlanan “SİGNUM PESTİSİDİ VE AKTİF MADDELERİNİN *IN VITRO* ŞARTLARDA İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİ ÜZERİNE MİKRONUKLEUS OLUŞTURMA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

Danışman

Prof. Dr. A. Yavuz ÇOTUK

Prof. Dr. C. Varol TOK

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 07/02/2011

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Hazırlanan bu Doktora tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2009/45 no'lu projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Akın ÇAYIR

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında her konuda bana destek olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, yönlendirmeleri ile tezin őekillenmesine büyük katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Mahmut COŞKUN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında kullanılan yöntemin geliştirilmesinde ve uygulanmasında büyük katkıları olan değerli hocam Öğr. Gör. Münevver COŞKUN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez alıőması boyunca gösterdikleri sabır ve destekten dolayı sevgili eőime ve oğluma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmasının yapılmasını maddi olarak destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'a teőekkürlerimi sunarım.

Akın ÇAYIR

SİMGELER VE KISALTMALAR

BFB	Breakage-Fusion-Bridge
BN	Binukleat (İki Çekirdekli Hücre)
BNMN	Binucleated Lymphocytes with Micronucleus (Mikronukleus İçeren Binukleat Hücre Sayısı)
CBMN	The Cytokinesis-Block Micronucleus
CBPI	Cell Blocked Proliferation Index (Sitokinez-Bloklama Proliferasyon İndeksi)
CHL	Chinese Hamster Lung
CHO	Chinese Hamster Ovary
DEL	Deltamethrin
DM	Double Minute
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EPA	US Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
ESAC	ECVAM Bilimsel ve Teknik Danışma Kurulu
EVCAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FISH	Floresan in Situ Hibridizasyon
IAEA	International Atomic Energy Agency
IARC	The International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı)
ISO	Isoproturon
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IWGT	International Workshop on Genotoxicity Testing
KA	Kromozom Aberasyonu
KCl	Potasyum Klorür
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
MMC	Mitomycine C
MN	Mikronukleus
MNL	Total Number of Micronuclei in Binucleated Lymphocytes (Toplam Mikronukleus Sayısı)
NADH	Nikotinamid Adenine Dinukleotid
NBUD	Nuclear Bud (Nuklear Tomurcuk)
NDI	Nuclear Division Index (Nuklear Bölünme İndeksi)

NNK	Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level
NPB	Nucleoplasmic bridges (Nukleoplazmik Köprüler)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)
PHA-M	Phytohaemagglutinin
PMRA	Pest management Regulation Agency
SFTG	Société Française de Toxicologie Génétique (Fransız Genetik Toksikoloji Topluluğu)
S9	Metabolik Aktivasyon Sistemi
SH	Standart Hata
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
LD ₅₀	Ortalama öldürücü dozu

ÖZET

SİGNUM PESTİSİDİ VE AKTİF MADDELERİNİN *IN VITRO* ŞARTLARDA İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİ ÜZERİNE MİKRONUKLEUS OLUŞTURMA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Akın ÇAYIR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

07/02/2011, 129

Bu çalışma, sitokinez bloklama-mikronukleus tekniği (CBMN) kullanılarak signum fungusiti ve aktif maddelerinin (boscalid ve pyraclostrobin) insan periferal kan lenfositlerinde olası genotoksik ve sitotoksik etki potansiyellerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Fungusitler ile muamele edilen lenfositlerde mikronukleus (MN), nukleoplazmik köprü (NPB) ve nükleer tomurcuklanma (NBUD) oluşumları ile sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi (CBPI) değerlendirilmiştir.

Her üç fungusitin test edilen konsantrasyonları, G_0 fazı ile siklusta ilerleyen lenfositlerde kontrol olarak kullanılan çözücü ortama göre daha fazla sayıda MN oluşumuna neden olmuşlardır. 2, 6, 25 $\mu\text{g/ml}$ signum, 0,5, 2 $\mu\text{g/ml}$ boscalid ve 0,5, 1,5, 2 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobin konsantrasyonlarının BNMN frekansını; 0,25 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobin konsantrasyonunun ise NPB frekansını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Fungusitlerin test edilen bütün konsantrasyonları G_0 fazı lenfositlerinde NBUD oluşumunu istatistiksel olarak arttırmazken, sitotoksisitenin konsantrasyona bağlı olarak arttığı saptanmıştır.

0,5, 1, 1,5, 3 $\mu\text{g/ml}$ signum, 0,5, 1, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ boscalid ve 0,75 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobinin BNMN frekansını; 1, 1,5, 2, 3 $\mu\text{g/ml}$ signum ile 0,75 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobinin ise NPB frekansını siklusta ilerleyen lenfositlerde istatistiksel olarak arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca 0,75 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobin, siklusta ilerleyen lenfositlerde istatistiksel olarak anlamlı NBUD oluşumuna neden olduğu, her bir fungusitin artan konsantrasyonları ile birlikte sitotoksisitenin arttığı görülmüştür.

Test edilen bazı konsantrasyonların istatistiksel olarak anlamlı derecede MN oluşumuna neden olması signum, boscalid ve pyraclostrobinin *in vitro* şartlarda insan periferel kan lenfositlerinde genotoksik etkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte her iki muamele şekli dikkate alındığında bu çalışmada değerlendirilen fungusitlerin sitotoksik olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Signum, Boscalid, Pyraclostrobin, Mikronukleus, Nukleoplazmik Köprü, Nuklear Tomurcuklanma, Sitotoksisite

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE MICRONUCLEUS FORMATION EFFECTS OF THE SIGNUM PESTICIDE AND ITS INGREDIENTS ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE *IN VITRO* CONDITION

Akın ÇAYIR

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair for Biology Thesis, PhD

Advisor: Prof. Dr. Mahmut COŞKUN

07/02/2011, 129

The aim of this study was to investigate the possible genotoxic and cytotoxic potential of the signum fungicide and its active ingredients (boscalid and pyraclostrobin) on human peripheral blood lymphocytes by using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. Micronucleus (MN), nucleoplasmic bridge and nuclear budding formations and the cell blocked proliferation index (CBPI) were evaluated in lymphocytes after treatment with fungicides.

Tested concentrations of each fungicide induced more MN formation compared to the solvent control in G₀ phase and proliferating lymphocytes. BNMN frequencies induced by 2, 6, 25 µg/ml signum, 0,5, 2 µg/ml boscalid and 0,5, 1,5, 2 µg/ml pyraclostrobin concentrations and NPB frequencies induced by pyraclostrobin increased statistically significant in G₀ phase lymphocytes. All concentrations of each fungicide in G₀ lymphocytes did not statistically increase NBUD formation, while the cytotoxicity was increased in a concentration-dependent.

BNMN frequencies induced by 0,5, 1, 1,5, 3 µg/ml signum, 0,5, 1, 1,5 µg/ml boscalid and 0,75 µg/ml pyraclostrobin and NPB frequencies induced by 1, 1,5, 2, 3 µg/ml signum and 0,75 µg/ml pyraclostrobin increased statistically in proliferating lymphocytes. In addition, 0,75 µg/ml pyraclostrobin increased NBUD frequencies in proliferating lymphocytes. Cytotoxicity increased with the increasing of the concentrations of each fungicide.

Because of the statistically significant increase of MN formation at the some concentrations, it could be concluded that signum, boscalid and pyraclostrobin are genotoxic in the *in vitro* condition on the human peripheral blood lymphocytes. However, evaluated fungicides in this study are cytotoxic considering each of the two treatments.

Keywords: Signum, Boscalid, Pyraclostrobin, Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge, Nuclear Bud, Cytotoxicity

İÇERİK	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
BÖLÜM 1 – GİRİŞ.....	1
1.1. MN Tekniği.....	4
1.2. MN Oluşum Mekanizmaları.....	5
1.3. CBMN Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları.....	10
1.4. Nukleoplazmik Köprüler.....	13
1.5. Nuklear Tomurcuklanmalar.....	14
1.6. MN Oluşumu ile Kanser Gelişimi Arasındaki İlişki.....	15
BÖLÜM 2 – ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Boscalid ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları.....	19
2.2. Pyraclostrobin ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları.....	21
2.3. Çeşitli Pestisitler ile İlgili Yapılan Genotoksikite Çalışmaları.....	23
BÖLÜM 3 – MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri.....	27
3.1.1. Signum.....	27
3.1.2. Boscalid.....	28
3.1.3. Pyraclostrobin.....	29
3.1.4. Pyraclostrobinin Etki Tarzı.....	30
3.1.5. Mitomisin C (Mitomycine-MMC).....	30
3.1.6. Dimetil Sulfoksit (DMSO).....	31
3.1.7. Sitokalasin B (Cytochalasin B).....	31
3.1.8. Fitohemaglutinin (Phytohaemagglutinin-PHA-M).....	32
3.1.9. Hipotonik Çözelti.....	32
3.1.10. Fiksatif.....	32
3.1.11. Giemsa.....	32
3.1.12. Sorenson Tamponun Hazırlanması.....	33
3.1.13. Entellan.....	33

3.1.14. Lamların Temizlenmesi.....	33
3.1.15. Sterilizasyon.....	33
3.1.16. MN Tekniği ve Lenfositlerin Fungusitler ile Muamelesi.....	33
3.1.17. CBPI'nin Belirlenmesi.....	36
3.1.18. Lenfositler.....	37
3.1.19. Çözücü ve Pozitif Kontrollerin Belirlenmesi.....	37
3.1.20. Hücre Kültürü Tekrarı.....	38
3.1.21. Değerlendirilen Hücre Sayıları.....	38
3.1.22. Deney Tekrarları.....	38
3.1.23. MN Frekansının Belirlenmesi.....	38
3.1.24. Değerlendirilen Çift Çekirdekli Hücrelerin (BN) Özellikleri	39
3.1.25. Sayılan Mikronukleusların Özellikleri.....	40
3.1.26. NPB Sayma Kriterleri.....	40
3.1.27. NBUD Sayma Kriterleri.....	41
3.1.28. Toksisitenin Belirlenmesi ve Doz Aralıkları.....	41
3.1.29. İstatistiksel Analiz.....	41
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Bulgular.....	43
4.1.1. Signumun G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	43
4.1.1.1. Signumun Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	43
4.1.1.2. Signumun Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	46
4.1.1.3. Signumun İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	49
4.1.2. Boscalidin G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	52
4.1.2.1. Boscalidin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	52
4.1.2.2. Boscalidin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	55
4.1.2.3. Boscalidin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde	58

Oluşturduğu Genotoksisite.....	
4.1.3. Pyraclostrobinin G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	61
4.1.3.1. Pyraclostrobinin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	61
4.1.3.2. Pyraclostrobinin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	64
4.1.3.3. Pyraclostrobinin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	67
4.1.4. Signumun Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	70
4.1.4.1. Signumun Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	70
4.1.4.2. Signumun Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	73
4.1.4.3. Signumun İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	76
4.1.5. Boscalidin Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	79
4.1.5.1. Boscalidin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	79
4.1.5.2. Boscalidin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	82
4.1.5.2. Boscalidin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	85
4.1.6. Pyraclostrobinin Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	88
4.1.6.1. Pyraclostrobin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	88
4.1.6.2. Pyraclostrobin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	91
4.1.6.3. Pyraclostrobin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite.....	94

4.2. Tartışma.....	98
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER.....	115
KAYNAKLAR.....	117
Çizelgeler.....	I
Şekiller.....	III
Özgeçmiş.....	VI

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency-EPA), dünyada yaklaşık olarak 84 000 çeşit kimyasalın kullanıldığı ve her yıl 1500 yeni kimyasalın insan hayatında yerini aldığını bildirmiştir (Denison, 2009). Toplam kimyasal madde miktarı içerisinde büyük bir paya sahip olan pestisitler, herhangi bir zararlının etkisini durduran veya azaltan, zararlıyı öldüren veya ortamdan uzaklaşması için kullanılan madde veya madde karışımları olarak tanımlanmaktadır (EPA, 2009). Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan pestisitlerin yapısında farklı kimyasal sınıflara ait birçok bileşik içerdikleri, 800'den fazla tarım ilacının yapısında birden çok kimyasal madde olduğu bilinmektedir.

Ticari olarak satılan bir pestisit, hedeflenen organizmaya karşı etkili olması beklenen aktif madde(ler) ile inert içerikten oluşur. EPA (2006) bir pestisit formülasyonunu, aktif madde ve inert içeriğin bir kombinasyonu olarak tanımlamaktadır. Tek bir pestisit farklı amaçlarla kullanılan birçok inert içerik içerebilir (EPA, 2005). İnert içerikler çözücü, sürfaktan, koruyucu ve benzeri değişik fonksiyonları olan kimyasallardır (EPA, 2002). Genel anlamıyla “inert” kelimesi fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak aktif olmayan anlamında kullanılmaktadır. Ancak EPA (2002), pestisit formülasyonunda kullanılan inert içeriğin biyolojik ve kimyasal olarak aktif olabileceği ve dolayısı ile insanlara toksik olabileceğini bildirmiştir.

Çeşitli zararlıların tarım ürünlerinde meydana getireceği zararı minimuma indirmek için uygulanan yöntemlerin başında kimyasal mücadele gelmektedir. Bu yöntem, hem uygulanabilme olanağı hem de etkili cevap alınabilmesi bakımından yaygın olarak kullanılmaktadır (Bolognesi, 2003). Bu anlamda dünyada her yıl yaklaşık 2,5 milyon ton pestisit uygulandığı ve zamanla bunun artacağı tahmin edilmektedir (Pimentel, 1995; FAO, 2002). Delen ve ark. (2005)'e göre Türkiye'de 1979 yılında 839 584 kg olan pestisit tüketimi 2002 yılında 12 198 917 kg olduğu bildirilmiştir. Birçok ülke ile karşılaştırıldığında Türkiye genelinde pestisit tüketim miktarının az olduğu ancak tarımsal arazilerin dağılımı ve yetiştirilen ürünlerin farklılığı nedeni ile bazı bölgelerde pestisit kullanımının daha fazla olduğu bilinmektedir.

Üretimi artırmak ve üretilmiş olan ürünü uzun süre korumak amacıyla kullanılan pestisitlerin, bu pestisitleri kullananlar veya dolaylı yollarla maruz kalanlar üzerinde zararlı etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu konuda Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) (1990) tarafından yayınlanan bildiride, her yıl yaklaşık 3 milyon

kişinin pestisit kullanımına bağlı olarak zehirlendiği, 200 000 kişinin akut toksisite nedeni ile öldüğü ve bu ölümlerin büyük çoğunluğunun özellikle gelişmiş ülkelerde meydana geldiği bildirilmiştir. Türkiye’de yapılan bir araştırmaya göre 1997 ile 2001 yılları arasında tarımda kullanılan çeşitli pestisitler nedeniyle 843 kişinin akut zehirlenme ile öldüğü tespit edilmiştir (Nesime ve ark., 2004). Bu durum, insan sağlığı bakımından yarattığı tehlike dikkate alındığında, yasaklanmış olan birçok pestisitinin tüm yasaklara rağmen kullanıldığını (Wilson, 2001; Sankararamakrishnan, 2005) veya yasaklı olmayan pestisitlerin de bilinçsizce uygulandığını göstermektedir.

Pestisitlerden en üst düzeyde fayda sağlarken, insan ve çevre sağlığı açısından oluşturacağı zararlı etkilerin en aza indirgenmesi, uygulayan ve ürünleri kullananlar üzerinde etkili olmaması amaçlanır. Ancak zararlı etkilerinin yeteri kadar bilinmemesi, hedeflenen organizmanın dışındaki diğer organizmaları etkilenmesi ve aşırı kullanılmalarından dolayı taşıdıkları riskler bulunmaktadır. Bu gibi nedenler, hedeflenen organizmaların zaman içinde uygulanan pestisitlere daha da dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Bu durum insanları yeni arayışlara yönlendirmekte ve farklı özellikler taşıyan kimyasalların üretilmesi ve kullanılması kaçınılmaz olmaktadır. Zararlılarla mücadele kapsamında 2000-2008 yılları arasında 71 yeni aktif maddenin üretildiği bildirmiştir (EPA, 2008).

Pestisitlerin akut toksisiteleri ile ilgili olarak birçok veri bulunmasına rağmen, kronik etkileri ile ilgili bilgiler azdır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (The International Agency for Research on Cancer-IARC) (2002), potansiyel karsinojen olan birçok insektisit, fungusit ve herbisit ile ilgili olarak yayınladığı raporda, deney hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda 56 pestisit çeşidinin karsinojen olduğunu bildirmiştir (Bolognesi, 2003). Kanser epidemiyolojisi konusunda yapılan çalışmalarda pestisitlere sürekli maruz kalan kişilerde lösemi, non-Hodgin lenfoma, mesane, pankreas, tiroit, nazal ve mide kanserlerinde artış, parkinson, düşük, ölü doğum ve doğumsal anomalisi olan çocuk oranında artış, erkek bireylerde fertilitede azalma olduğu belirlenmiştir (Sivikova, 1999a; Pastor, 2002; Abell, 2000). Gelişmiş ülkelerde yılda 37.000 kişinin pestisit kullanımına bağlı olarak kansere yakalandığı rapor edilmiştir (WHO, 1990). Bununla birlikte, bakteri ve memeli sistemleri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda son yıllarda sıklıkla kullanılan klorlanmış-organikler, karbamatlar, organofosfatlar ve piretroitlerin genotoksik etkilerinin olduğu (Testa, 2002; Zhang, 1996; Albertini, 1997; Anwar, 1994; Vaglenov, 1997), birçok pestisitinin mutajenik özelliğe sahip olduğu ve potansiyel kimyasal mutajenler oldukları bildirilmiştir (Bolognesi, 2003).

Pestisitlerin etkisiyle oluşan genetik değişimler, gen mutasyonları, yapısal ve kromozomal değişimler şeklindedir. Parry ve ark. (2002)'na göre Duesberg ve ark. (1999) ve Cowell (2001)'in yaptıkları çalışmalarda genetik değişimlerin karsinogenez sürecinde etkin rol oynadıkları bildirilmiştir. Kimyasallardan kaynaklı genetik değişimlerin (özellikle kanser ve doğum anomalisi ile ilgili) ortaya çıkarılması, bilim insanlarını kimyasalların genotoksik potansiyellerini araştırmaya ve bu anlamda geçerli metotları geliştirmeye teşvik etmiştir.

Kimyasalların etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve toksisite seviyelerinin belirlenmesi ile ilgili birçok yöntem mevcuttur. *In vivo* ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen bu testler sayesinde toksik maddelere ilişkin çeşitli parametreler belirlenmektedir. Toksikolojik çalışmaların temelini oluşturan genetik toksikoloji, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda çeşitli ajanların tek başlarına veya birlikte DNA'da meydana getirdikleri değişiklik veya mutasyonları belirlemeye çalışmaktadır. Son yıllarda, değişik genetik değişimlere etkin cevap verebilmesi amacıyla birçok test kullanılmıştır. Metabolik aktivasyon sistemlerinin (S9 karışımı) keşfedilmesi ile birlikte bakteri ve memeli sistemlerinin kullanıldığı *in vivo* yöntemler yerine, hızlı cevap alınabilmesi, ekonomik olması, fazla iş yükü gerektirmemesi, aynı anda çok sayıda veri elde edilmesi gibi nedenlerden dolayı *in vitro* yöntemler tercih edilmektedir. DNA'da meydana gelen değişiklikler sonucunda ortaya çıkan kalıcı ve geçici genotoksik cevapların ortaya çıkarılması için birçok biyo-belirleyici (biyomarkır) bulunmasına rağmen, *in vitro* ve *in vivo* ortamda meydana gelen genotoksik etkilerin ortaya çıkarılmasında kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (KA) ve mikronukleus (MN) oluşumu gibi sitogenetik yöntemler kullanılmaktadır (Bonassi ve ark., 2008). Bu belirleyiciler, diğer genotoksik ajanlar (radyasyon) gibi, kimyasalların DNA'da oluşturduğu erken biyolojik hasar derecelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada değerlendirilen *signum* fungusiti ve aktif maddeleri olan boscalid ve pyraclostrobin BASF firması tarafından geliştirilmiş ve onay alındıktan sonra piyasaya sürülmüştür. Yapılan araştırmalar, *signum* fungusiti ve aktif maddeleri ile ilgili karsinojenik, mutajenik ve genotoksik özelliklerine ait bilgilerin sadece üretici firmaya ait olduğu görülmektedir. Bununla birlikte BASF firmasının yapmış olduğu araştırmalara dayanarak EPA ile Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO) tarafından değerlendirilen bu üç kimyasalın genotoksik etkilerinin insan periferik kan lenfositlerinde araştırılmadığı görülmektedir. Hauke ve ark. (2004), yeni bir fungusit olan *signum*'un dünyada etkili bir şekilde kullanıldığı ve kullanımının her geçen gün arttığını

bildirmiştir. Tez çalışmasında ticari olarak satılan signum, aktif maddeleri boscalid ve pyraclostrobinin çeşitli konsantrasyonları ile kültür ortamında muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde oluşabilecek genotoksisitelerinin sitokinez bloklama-mikronukleus tekniği (CBMN) kullanarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

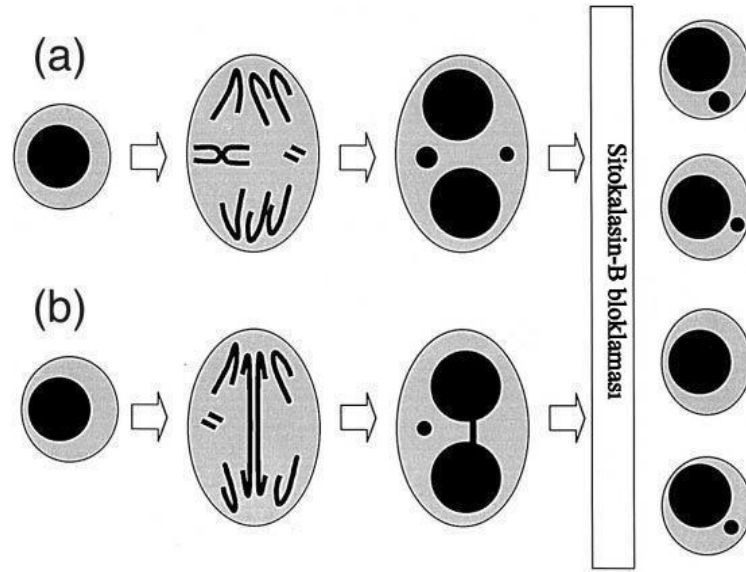
Bu çalışmayla, insan periferal kan lenfositleri ile değişik konsantrasyonları muamele edilen bu üç kimyasalın genotoksik potansiyeline ilişkin literatür eksikliği giderilmiş olacaktır. Ayrıca, uygulanan konsantrasyonlar ile elde edilen MN frekansı arasındaki ilişki incelenecek ve olası doz-cevap ilişkisi belirlenecektir. Değerlendirilen pestisitlerin genotoksik potansiyellerinin yanında oluşturacakları sitotoksisite ile ilgili bilgiler de elde edilecektir. Elde edilecek veriler Türkiye’de de yakın bir geçmişte kullanımına başlanan signumun olası kalıntı durumlarında bireylerde oluşabilecek genetik riskin değerlendirilmesine ve eksik olan literatür bilgisine katkı sağlayacaktır.

1.1. MN Tekniği

In vitro MN tekniği, interfaz hücrelerin sitoplazmalarında oluşan MN’lerin değerlendirilmesine olanak sağlayan bir genotoksisite testidir (OECD, 2007). Bu yöntem, hücre bölünmesi sırasında veya sonrasında test maddelerine maruz kalan hücrelerde meydana gelen aneujenik (kromozomlarda sayısal değişiklikler) ve klastojenik (kromozomlarda yapısal değişiklikler) aktivitelerin değerlendirilmesine olanak sağlar (OECD, 2007). Klasik sitogenetik tekniklerde, kromozomlar metafaz evresinde incelenmekte, ortaya çıkan hasarlar gözlemlenmekte ve değerlendirilmektedir (Natarajan ve Obe, 1982). Bu yaklaşım detaylı bir araştırma olanağı sunmakla birlikte kompleks olması, fazla iş yükü gerektirmesi ve deney sırasında oluşan artefaktların yanlış değerlendirilmesinden dolayı bilim adamlarını yeni arayışlara sevk etmiştir. 1960’lı yıllarda klasik metafaz KA yöntemine alternatif olabilecek ve daha basit bir yöntem olan MN tekniği geliştirilmeye başlanmıştır. Bu dönemde radyasyona maruz bırakılan *Vicia faba* kök meristem hücrelerinde MN frekansı belirlenmiştir. Natarajan (2002)’ye göre Schmid (1976) MN tekniğini fare kemik iliği polikromatik eritrositler için standardize etmiş ve ortaya çıkan kromozom hasarlarını MN frekansı şeklinde belirlemiştir.

MN tekniği yalnızca bölünebilen ökaryotik hücrelere uygulanmaktadır. Diğer bir deyişle, bölünmeyen, bölünme kinetiği bilinmeyen veya kontrol edilemeyen hücre popülasyonlarında etkili bir şekilde kullanılamamaktadır. Birden fazla hücre siklusu geçiren bir hücrede oluşan MN’nin akıbeti hakkında kesin bilgiler bulunmamaktadır. Bundan dolayı kültür ortamında sadece bir kez bölünen hücrelerde MN frekansını

saptamak güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Fenech, 2000). Bir hücre popülasyonunda bölünen ve bölünmeyen hücrelerin ayırt edilebilmesi MN tekniğinin önemli gelişim aşamalarından biridir. 1985 yılında Fenech ve Morley'in sitokalsin-B'yi MN tekniğinde kullanmaları ile bu özellik başarılmıştır (Fenech ve Morley, 1985). MN tekniğinde, bir çekirdek bölünmesini tamamlayan hücreler sitokalsin-B ile bloke edilirler. Bu aşamada sitoplazma bölünmesi (sitokinez) sırasında iki yavru çekirdek arasındaki sitoplazmanın boğumlanmasında görevli olan mikofilament halkasının oluşmasında rol oynayan aktin polimerizasyonu sitokalsin-B tarafından engellenir (Fenech, 2000). Hücreler bu işlemten sonra iki nukleuslu (binukleat-BN) olarak görülmektedirler. Sitokalsin-B'nin uygulandığı hücre popülasyonlarında hücrelerin büyük bir çoğunluğu BN aşamasında birikmektedirler. Bu teknik, günümüzde sitokinez blokla-mikronukleus tekniği (CBMN) yöntemi olarak bilinmektedir. CBMN yöntemi, genetik toksikoloji alanında standart bir yöntem haline gelmiştir (Fenech, 2006).

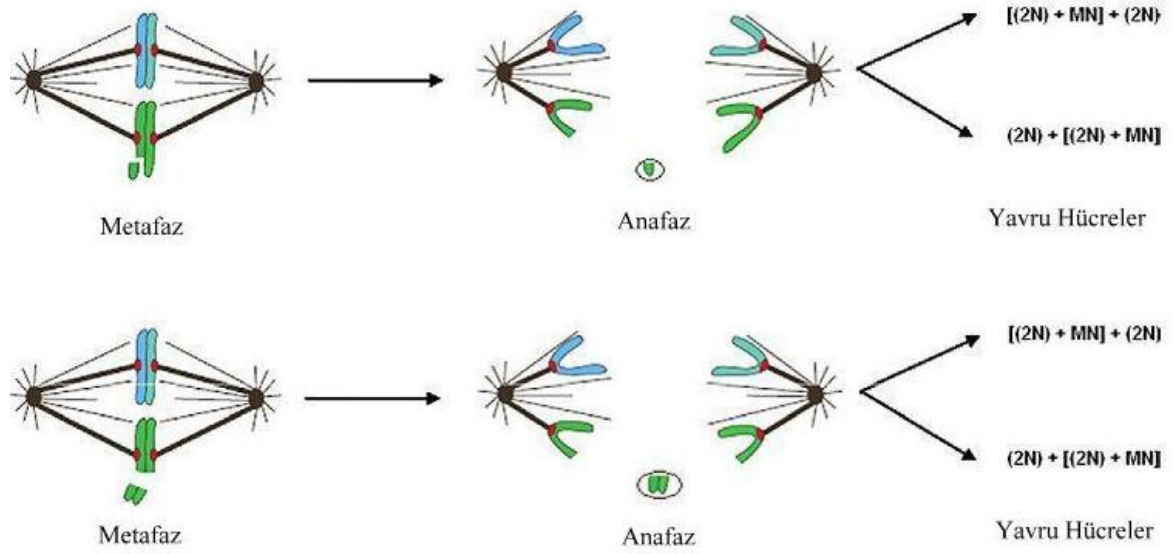


Şekil 1. (a) Tüm kromozom ve asentrik kromozom parçasından MN oluşumu, (b) Zıt kutuplara çekilen disentrik kromozomun oluşturduğu nukleoplazmik köprü (NPB) ve beraberinde oluşan MN. Bölünen hücrelerde sitokalsin-B'nin binukelat aşamasındaki rolü (Fenech, 2000)

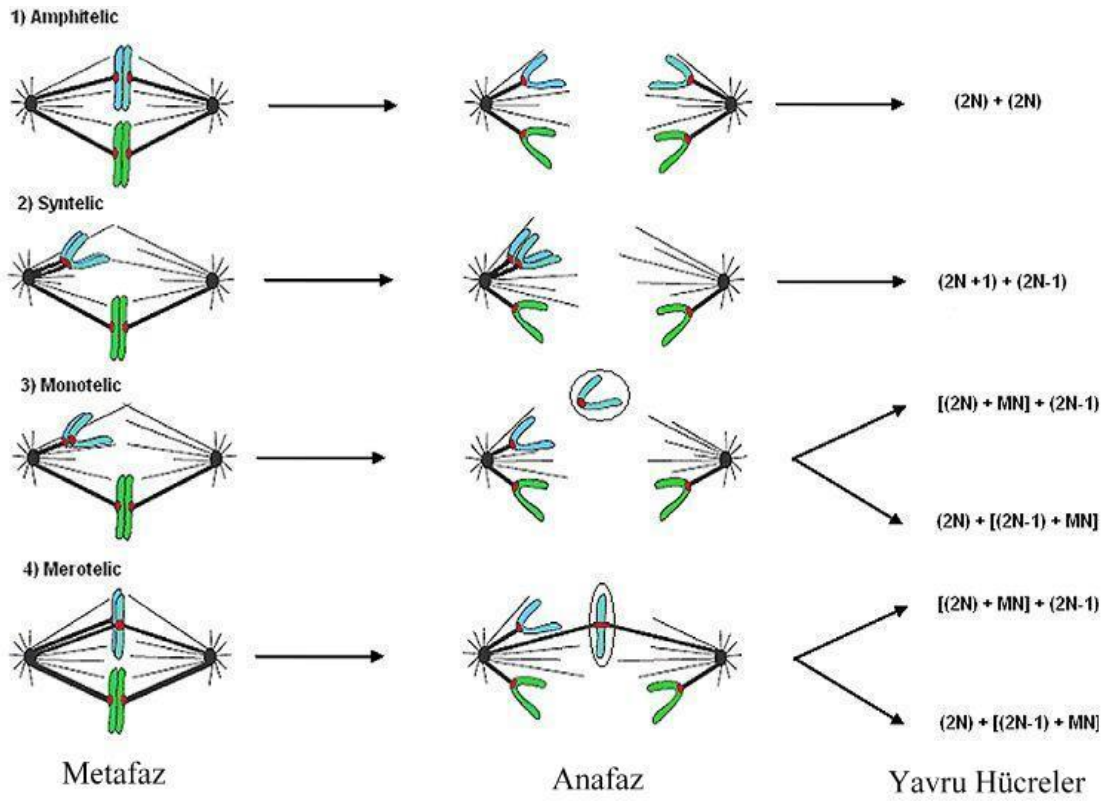
1.2. MN Oluşum Mekanizmaları

MN, hücre bölünmesinin anafaz safhasında kutuplara çekilemeyen tüm kromozom(lar), kromatid (ler) veya asentrik kromozom/kromatid parçalarından oluşan nukleus dışı küçük bir yapı olarak tanımlanmaktadır (Fenech, 1985). Geride kalan

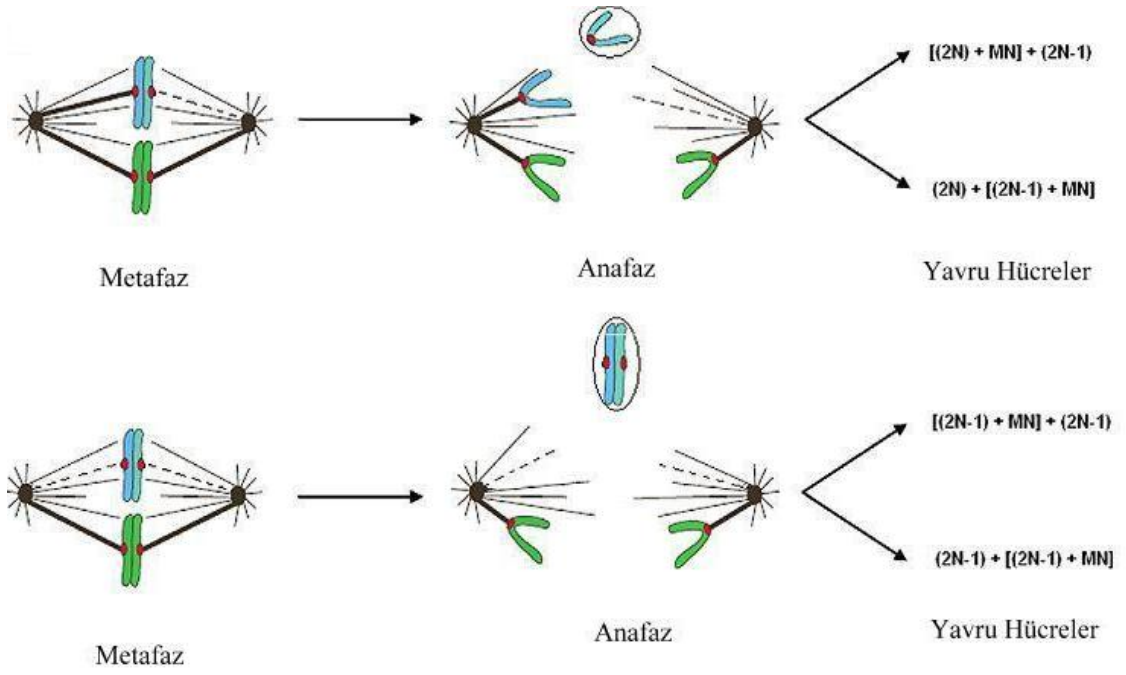
kromozom parçaları ve/veya kromozomların etrafında mitoz bölünmenin telofaz safhasında bir çekirdek zarı oluşmakta ve daha sonra interfaz safhasındaki ana nukleusun morfolojisini almaktadır (Fenech, 2000). Kromozomal parçalardan oluşan MN'ler, doğrudan çift iplikli kırıklardan, genetik replikasyondan sonra tek iplik kırıklarının çift iplik kırıklarına dönüştürülmesinde veya DNA sentezinin inhibe edilmesi sonucunda oluşabilirler. İki kromozom kırığının yanlış tamir edilmesiyle, disentrik (iki sentromerli) kromozom ve bir asentrik (sentromersiz) parçanın oluşması ile sonuçlanan asimetric kromozom yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Çoğunlukla oluşan bu disentriklerin sentromerleri hücre bölünmesinin anafaz safhasında zıt kutuplara çekilirler. Sonucunda iki yavru nukleusu birleştiren NPB'ler ve asentrik parçaların oluşturduğu MN'ler görülürler (Fenech, 2000). Tüm kromozom(lar)dan oluşan MN'ler, kromozom ayrılma mekanizmasındaki hatalardan (hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki işlev bozukluğu, mitotik ipliklerin, kinetokor ve mitotik aygıtın görevlerini tam yapamaması), hücreyel fizyolojinin değişmesi, mekanik hasarlar (Albertini ve ark., 2000) ve sentromerik DNA'nın hipometilasyonundan dolayı oluşabilirler (Fenech ve ark., 2005). MN'ler ayrıca breakage-fusion-bridge (BFB) ile oluşan gen amplifikasyonları sonucunda da oluşabilirler. Amplifiye edilmiş DNA seçici bir şekilde nukleusun periferinde bir çıkıntı olarak yerleşmekte ve hücre siklusunun S fazında nuklear tomurcuk (nuclear bud-NBUD) olarak elimine edilmektedir (Fenech, 2002). Fenech (2007), MN oluşumunun DNA hipometilasyonu sonucu oluştuğunu bildirmiştir. DNA metilasyonu inhibitörü olan 5- azacytidinenin 1, 9 ve 16. kromozomların heterokromatin bölgelerinde kondensasyona neden olduğu ve bu kromozomlarda meydana gelen kayıpların MN'yi oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca mitotik iplikleri kontrol nokta gen (APC, BUB1 and HCDC4) CpG adacıklarının hipermetilasyonu, bu genlerin anlatımlarını azaltabilmektedir. Bu durumun MN oluşumuna yol açacak kromozom yanlış ayrılmalara sebep olduğu bildirilmiştir (Fenech, 2006). Ayrıca yapılan çalışmalar MN oluşumunun, DNA satellit hipometilasyonunun bir sonucu olarak arttığı bildirilmiştir.



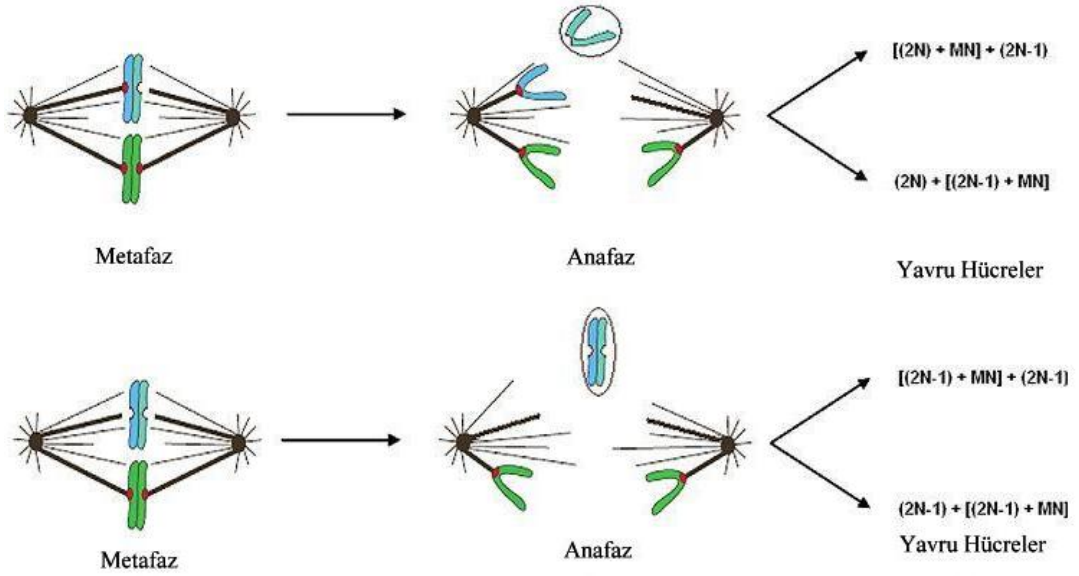
Şekil 2. Asentrik kromozom/kromatid parçalarından MN oluşumu (Mateuca ve ark., 2006)



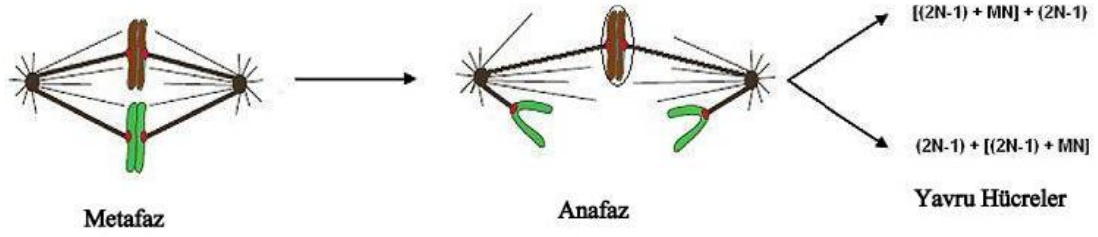
Şekil 3. Tubulin ipliklerinin kinetekora yanlış bağlanmasından dolayı kutuplara çekilemeyen kromozom/kromatidlerden oluşan MN (Mateuca ve ark., 2006)



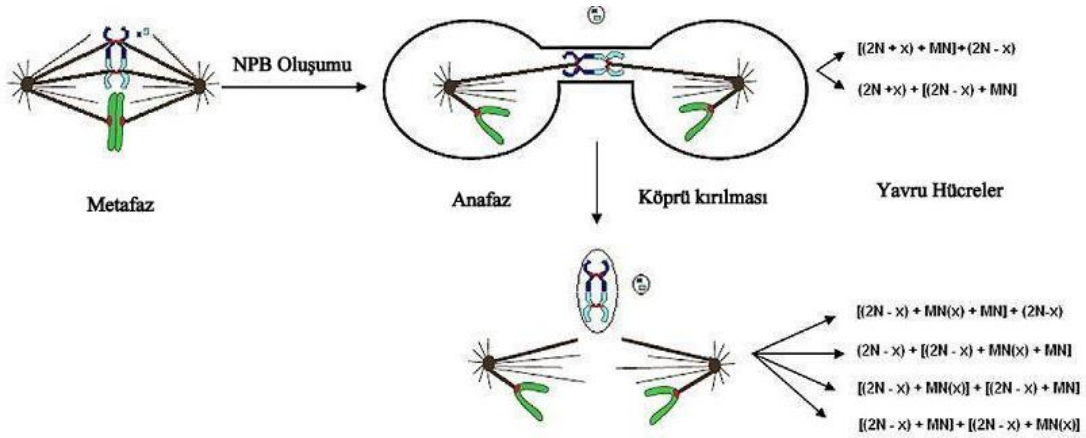
Şekil 4. Tubulin depolimerizasyonu sonucu kutuplara çekilemeyen kromozom/kromatidlerin oluşturduğu MN (Mateuca ve ark., 2006)



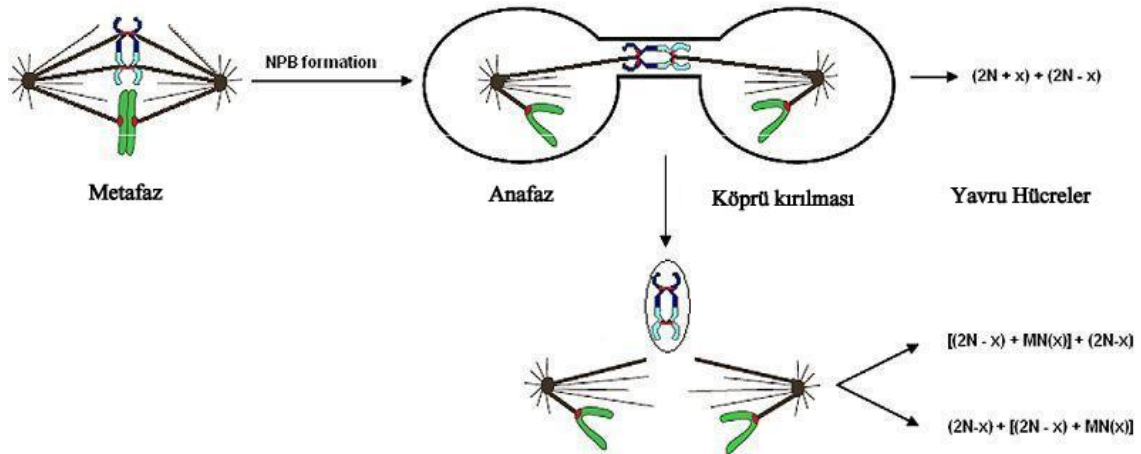
Şekil 5. Sentomerik DNA, kinetektor veya kinetektor proteinlerindeki hasarlanmalar sonucu oluşan MN (Mateuca ve ark., 2006)



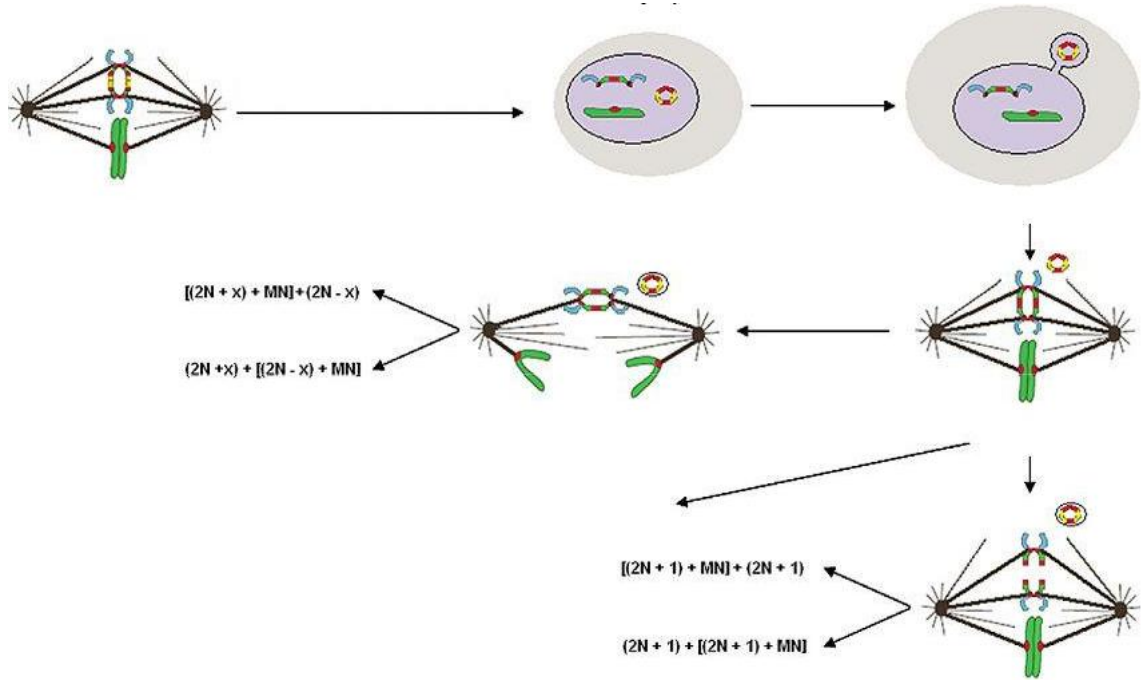
Şekil 6. Geç replikasyon, kromozom/kromatidlerin nukleus periferasında bulunmaları ve histon proteinlerinin epigenetik modifikasyonu sonucu oluşan MN (Mateuca ve ark., 2006)



Şekil 7. İki kromozom kırığının yanlış tamir edilmesi sonucu oluşan nukleoplazmik köprü ve/veya oluşan köprünün kırılması sonucu oluşan MN (Mateuca ve ark., 2006)



Şekil 8. Telomer uç birleşmesi ve oluşan köprülerin kırılması sonucu oluşan MN (Mateuca ve ark., 2006)



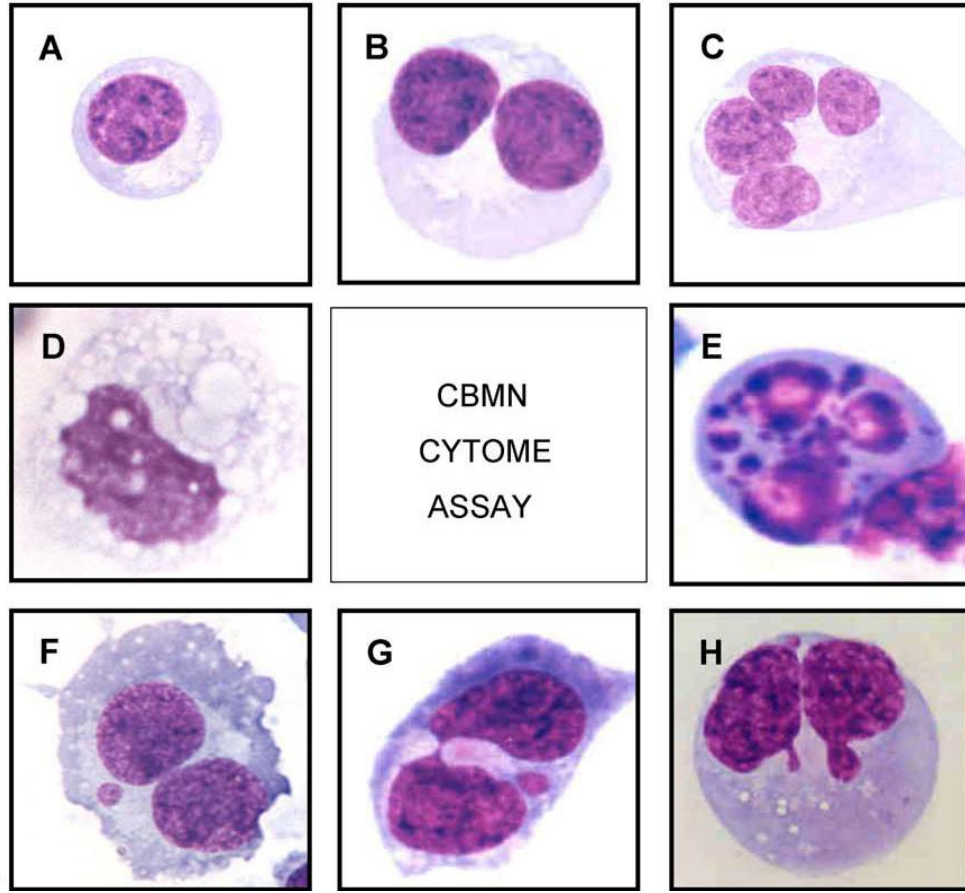
Şekil 9. Nukleusun spesifik bölgelerinde seçici olarak lokalize olan gen amplifikasyon bölgelerinin BFB siklusu sonucunda oluşturduğu MN (Mateuca ve ark., 2006)

1.3. CBMN Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

CBMN yönteminin kromozom hasarlarını göstermede klasik metafaz kromozom analizi kadar duyarlı olduğu gösterilmiştir (Fenech ve ark., 1999a). DNA hasar göstergesi olan MN'ler yavru hücrelere aktarılırken metafaz kromozomlarında meydana gelen hasarlar yavru hücrelere aktarılmayabilirler (OECD, 2007). KA yöntemi ile kıyaslandığında, MN'nin preparatta sayımının daha kolay olduğu, sayacak kişinin kısa zamanda ve kolaylıkla eğitilebildiği ve sayım için daha az zaman gerektiği görülmektedir (Norppa ve Falck, 2003). Ayrıca CBMN yönteminde binlerce BN hücreyi değerlendirmek mümkündür. Buna karşılık KA yönteminde 100 veya birkaç 100 metafaz kromozomu değerlendirilebilmektedir. Dolayısı ile değerlendirilen BN sayısının fazla olması istatistiksel değerlendirmede daha gerçekçi sonuçların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. CBMN yönteminde hücre kültürünü 24-48 saat süre zarfında sitokalsin-B ile durdurulabildiğinden çok sayıda binükleat hücre elde etmek mümkündür. Ancak KA yönteminde hücrelerin sitokinezde durdurulması 1-4 saat sürmekte, daha uzun süre durdurma kromozomların daha da kalınlaşmasına neden olmakta bu durum değerlendirmelerini zorlaştırmaktadır. Son yıllarda CBMN yönteminde binükleat sayımının otomasyon sistemi ile yapıyor olması aynı çalışmayı değerlendiren birden fazla kişi arasında ortaya çıkabilecek farklılığı da ortadan kaldırmaktadır (Mateuca ve ark., 2006).

CBMN yönteminin en önemli avantajı klastojenik ve aneujenik kromozom hasarlarının ikisini de aynı anda değerlendirebilme olanağıdır (Fenech, 1999a, 2000). MN'nin yapısı ile ilgili olarak yapılan sentomer ve kinetektor çalışmaları ile CBMN tekniğinin birleştirilmesi sonucu, oluşan bir MN'nin orijini hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Tüm kromozomlardan veya kromozom parçalarından oluşan MN'ler arasında ayırımın yapılması CBMN yönteminin duyarlılığını ve özgünlüğünü arttırmaktadır. Sentromerik bölgeyi tanımlamak için kullanılan *in-situ* hibridizasyon yöntemi ile kromozomlara özgü problemlerin kullanılması sonucu BN hücrelerdeki iki nükleus arasında dengesiz kromozom dağılımına neden olan non-disjunction (ayrılmama) saptanabilmektedir. Bu yöntemde kinetektor proteinleri ve sentromerik DNA dizileri içermeyen MN'ler asentrik kromozom parçaları olarak kabul edilmektedir (Fenech, 1999a).

Kullanılmaya başlandığı günden beri sürekli olarak geliştirilen CBMN tekniği kromozom kırıkları, kromozom kayıpları ve kromozom ayrılmama olaylarının yanında nekroz, apoptoz ve hücre gelişmesinin durdurulması (cytostasis) olaylarını da değerlendirebilmesinden dolayı çok kapsamlı bir metot olarak değerlendirilmektedir (Fenech, 2006). Bu özelliklerinin yanında, yapılan yeni çalışmalarla CBMN tekniğinde DNA yanlış tamiri ve telomer uç birleşmesi ile disentrik biyomarkırı olarak tanımlanan NPB'lerin değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca gen amplifikasyonu veya gen dozajlarının bir göstergesi olan NBUD'ların da bu teknik sayesinde değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Fenech, 2006). CBMN tekniği, hücrede oluşan hasarların göstergeleri olan birçok olayı (kromozomal kararsızlıkları, mitotik işlev bozukluklarını, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gibi) aynı anda değerlendirebilmesinden dolayı "Cytome assay" olarak tanımlanmaktadır. Fenech (2006)'e göre Cytome assay; çalışılan bir sistemdeki her bir hücre canlılık özelliği bakımından (nekroz, apoptoz) sitolojik olarak sayılabilmekte, mitotik durumu (tek çekirdekli, metafaz, anafaz, iki nükleuslu ve çok nükleuslu) ve kromozomal kararsızlığı (MN, NPB, NBUD, sentromer ve kinetektor problemlerin kullanılması durumunda MN içeriği) bakımından değerlendirilebilmektedir (Fenech, 2006).



Şekil 10. A: Mononukleat hücre, B: BN hücre C: Polinukleat hücre, D: Nekrotik hücre, E: Apoptotik hücre, F: MN, G: NPB ve MN, H: NBUD (Fenech, 2006)

CBMN tekniğinin önemli avantajlarından bir diğeri ise bölünen hücre popülasyonlarında nukleus bölünmesinin ilerlemesi ve derecesinin kolaylıkla ölçülebilmesidir. Bu durum sitokalsin-B eklendikten sonra belli bir süre kültürde kalan hücrelerden tek, iki, üç ve dört nukleuslu hücrelerin sayımı ile elde edilmektedir. Nuklear bölünme indeksi (Nuclear Division Index-NDI) veya sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi (Cell Blocked Proliferation Index-CBPI) olarak tanımlanan bu yöntem Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilmiştir. NDI'nin ölçülmesi fiziksel veya kimyasal ajanların sitotoksik özellikleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. NDI ve BN hücrelerin oranı hücrelerin kültür sırasında uygulanan mitojene verdiği cevap ile çalışmada değerlendirilen ajanların sitotoksik etkilerinin ölçülmesinde yararlı bir yöntemdir (Fenech, 1997).

In vitro MN tekniği sitokalsin-B'nin kullanıldığı veya kullanılmadığı birçok hücre tipi için güçlü ve etkili bir yöntemdir (OECD, 2007). Bu tekniğin doğruluğunun kanıtlandığı birçok çalışma bulunmaktadır. CHO (Chinese Hamster Ovary), V79, CHL (Chinese Hamster Lung) ve L5178Y gibi birçok hücre tipinin kullanıldığı çalışmaların

yanında insan lenfositlerinin kullanıldığı birçok çalışma da bulunmaktadır (Lorge, 2006; Aardema, 2006; Oliver, 2006; Kersten, 1999). Fransız Genetik Toksikoloji Topluluğu (Société Française de Toxicologie Génétique-SFTG) (Lorge, 2006; Aardema, 2006; Oliver, 2006) tarafından gerçekleştirilen uluslararası geçerlilik çalışmaları ile uluslararası genotoksisite testleri çalışmayı (International Workshop on Genotoxicity Testing-IWGT) (Kirsch-Volders, 2000, 2003) tarafından yayınlanan raporlar, *in vitro* MN tekniğinin geçerliliğini doğrulayan önemli verilerdir. Ayrıca şimdiye kadar yayınlan veriler Avrupa Alternatif Metotların Değerlendirilmesi Merkezi (European Centre for the Validation of Alternative Methods - EVCAM) tarafından tekrar değerlendirilmiş, yöntemin geçerliliği ECVAM Bilimsel ve Teknik Danışma Kurulu (ESAC) tarafından uygun bulunmuştur (ECVAM, 2006; ESAC, 2006).

Diğer taraftan CBMN tekniğinin çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Yöntemin uygulanması sırasında kullanılan sitokalsin-B'nin MN oluşumuna neden olması en önemli dezavantajı olarak değerlendirilmektedir. İnsan lenfositleri, fare dalak lenfositleri, fare fibroblastları gibi hücrelerle yapılan çalışmalarda 1-6 µg/ml aralığındaki sitokalsin-B'nin doza bağlı olarak MN frekansında bir artışa neden olmadığı bildirilmiştir (Fenech, 1997). Fenech (1997)'e göre Kolber (1990), bazı spesifik neoplastik hücre tiplerinin (EL4, BW5147) sitokalsin-B'ye daha duyarlı olabileceğini bildirmiştir. Sitokalsin-B'nin kullanılması, sitokalsin ile aynı etki tarzına taşıyan kimyasalların özelliklerinin belirlenmesinde sorun olacağı ve bu kimyasalların etki tarzlarının görülemeyebileceği bildirilmiştir (Fenech, 1997).

1.4. Nukleoplazmik Köprüler

Fenech (2006), CBMN tekniğinde binükleat hücrelerde iki nukleus arasında yer alan NPB'lerin sayılması gerektiğini bildirilmiştir. Böylece BN hücrelerde bulunan MN'lerin sayılması ile birlikte bir kromozom yeniden düzenlenme (re-arrangement) ifadesi olan NPB'ler de değerlendirilmiş olacaktır (Umegaki ve Fenech, 2000). NPB'ler genel olarak herhangi bir ajana maruz kalan bir hücrede oluşan bir disentrik (iki sentromerli) kromozomun mitoz bölünmenin anafaz safhasında zıt kutuplara çekilirken oluştuğu düşünülmektedir. BN hücrelerde bulunan iki nukleusu birbirine bağlayan yapılar olduğu için NPB olarak tanımlanmaktadır. Fenech (2006), normal hücre bölünmesinde nukleer membran oluşmadan önce disentrik anafaz köprülerinin gözlenmesinin zor olduğunu, hücrelerin anafaz ve telofaz safhalarını hızlı bir şekilde geçerek sitokinezi tamamladıkları ve yavru nukleusların ayrılmalarından dolayı olası NPB'lerin kırıldığını ifade etmiştir.

Ancak CBMN tekniğinde sitoplazma bölünmesinin sitoklasin-B ile inaktive edilmesinden dolayı BN hücreler arasında yer alan NPB'ler kırılmayarak görünür hale gelirler. Ayrıca Fenech (2006) oluşan NPB ifadesi olan kromozomların etrafında oluşan zar nedeni ile de gözlemlendiklerini bildirmiştir.

Umegaki ve Fenech (2000) yaptıkları çalışma ile hidrojen peroksit, superoksit ve aktive edilen insan nötrofilleri ile inkübe edilen WIL2-NS hücrelerinde NPB'lerin bir DNA hasarı göstergesi olması bakımından bir biyomarkır olarak kullanılabileceğini doğrulamışlardır. Bu çalışmada, DNA'da iplik kırığı oluşturan kimyasallar ile doza bağlı elde edilen DNA hasarı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre BN hücrelerdeki NPB frekansının kontrole göre 20 kat kadar arttığı görülmüştür. Bu çalışmada, aynı binukleat hücrelerde sayılan MN'ler ile NPB'ler arasında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon bulunmuştur. Bir veya birden fazla NPB'ye sahip BN hücrelerin %60'ından fazlası aynı zamanda bir veya birden fazla MN içermektedir. Bu durum MN olarak ifade edilen asentrik kromozom parçaları ile NPB olarak ifade edilen disentrik kromozomların aynı hücre içinde birlikte ifade edildiğini göstermektedir.

DNA'daki iplik kırıklarının yanlış tamir edilmesinden sonra NPB'leri oluşturan değişik mekanizmaların olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizmalardan bir tanesi telomer uç birleşmesi olarak tanımlanmakta ve telomer kısalmasının bu mekanizmaya neden olduğu bildirilmiştir. Fenech (2006) bu durumda meydana gelebilecek NPB'ye bir MN'nin eşlik etmeyeceğini ifade etmiştir. Rodent modelleri ve insan intestinal sistem kanserleri ile yapılan çalışmalarda telomer uzunluğu ile NPB'ler arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş ve NPB insidansının telomer kısalmasının bir ölçüsü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Rudolph ve ark., 2001). Fenech (2006)'e göre NPB'lerin DNA'nın yanlış tamir edilen parçalarından oluştuğunu ve genom hasarını doğrudan gösterdiği için CBMN tekniğinde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmiştir. Kromozom kayıp veya kırıklarını ifade eden MN'nin değerlendirilmemiş olması durumunda DNA'da meydana gelen farklı hasarlanmaların göz arda edilmiş olacağı bildirilmiştir.

1.5. Nuklear Tomurcuklanmalar

NBUD, gen amplifikasyonuna neden olan özel kültür şartlarında büyüyen hücrelerde gösterilmiştir (Ma, 1993; Shimura, 1999). Bununla birlikte Shimuzi (1998, 2000) memeli hücreleri ile yaptığı deneylerde amplifiye edilmiş DNA'nın seçici olarak nukleusun periferinde lokalize olduğu ve NBUD olarak elimine edildiğini göstermiştir. Bu modelde meydana gelen tomurcuk, mitoz bölünmenin S fazı boyunca MN oluşturmak üzere elimine

edilmektedir. Nukleusun amplifiye edilmiş DNA dizilerine karşı hassas olduğu bildirilmiştir. Shimuzi (1998, 2000)'ye göre nukleusun fazla amplifiye DNA'yı aktif bir işlemle elemine ettiği, bunu amplifiye DNA'yı nukleusun periferinde biriktirerek yaptığı, fazlalık olan bu DNA'nın MN oluşturmak üzere tomurcuklanma yapığı ve bu yolla elimine ettiğini açıklamıştır.

Lindberg ve ark. (2007)'na göre Gisselsson ve ark. (2001), NBUD'ların anafaz köprülerin kırılması sonucu meydana geldiğini bildirmiştir. Bu modelde BN hücreler arasında meydana gelen bir NPB'nin farklı iki yerinde kırılması sonucu, oluşan parçanın MN'yi oluşturacağı ifade edilmiştir. Bununla birlikte meydana gelen anafaz köprüsünün tek bir yerinde kırılması durumunda ana nukleuslara bağlı kalan parçaların NBUD'ları oluşturacağı ileri sürülmüştür. Bu modelde ileri sürülen anafaz köprülerinin kırılması olayının, sitokinezi bloklanmış BN hücrelerde nasıl olduğu açık değildir. Bununla birlikte Lindberg ve ark. (2007) tarafında yapılan çalışmada, NBUD'ların yapılarında tüm kromozomların da bulunduğu, dolayısı ile NBUD'ların sadece anafaz köprü kırıklarından oluşamayacağı bildirilmiştir.

Lindberg ve ark. (2007)'na göre Tanaka ve Shimizu (2000) tarafından COLO 320DM hücrelerinde yapılan çalışmada MN ve NBUD oluşumu amplifiye edilmiş double minutelarla (DM) açıklamışlardır. Meme, akciğer, kolon gibi insan tümörlerinde gözlemlenen ekstrakromozomal DNA parçaları olan DM'ler, tümör gelişimi sırasında gen amplifikasyonunun bir göstergesi olarak bilinmektedirler. Tanaka and Shimizu (2000), modeline göre, sitoplazmada kalan bazı DM'lerin mitoz bitiminde lamin tarafından yakalandığı ve MN oluşturdukları ileri sürülmüştür. Bununla birlikte bazı DM'lerin lamin B'nin yeniden düzenlenmesi ile DNA sentezinden bağladığı S fazından sonra yakalandığı ve NBUD'ları oluşturduğu ifade edilmiştir.

NBUD, ana nukleuslarla bağlantıyı sağlayan kalın veya ince saplarının dışında MN ile aynı morfolojik özelliğe sahiptirler. Sahip oldukları kalın veya ince saplar tomurcuklanmanın bulunduğu sürece göre değişiklik göstermektedir. Tomurcuk oluşturma süresi ve hücreden MN oluşturmak üzere ayrılması daha aydınlatılmış değildir (Fenech, 2006).

1.6. MN Oluşumu ile Kanseri Gelişimi Arasındaki İlişki

Gelişmiş ülkelerde kanser, kardiyovasküler hastalıkların neden olduğu ölümlerden sonra ikinci sırada yer alan ölüm nedenidir (Murgia ve ark., 2008). Kanseri önleme çabaları arasında, kanserin gelişimini önceden haber veren biyomarkırların geliştirilmesi ve

geliştirilen biyomarkırların bu anlamda geçerliliğinin doğrulanması gelmektedir. Kanser riskini göstermede biyomarkır olarak kullanılan KA, KKD ve MN tekniği gibi sitogenetik yöntemler, insan periferal kan lenfositleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Özellikle elde edilen bazı olumlu sonuçlar nedeni ile bu yöntemler son yıllarda büyük ilgi odağı haline gelmiş durumdadır. KA yöntemi, bütün kanser riskleri ile kromozom hasarları arasındaki ilişkiyi doğrulayan ilk biyomarkırdır. Bu yöntemin, meydana gelen kromozom hasarları ile kanser riski arasındaki ilişkiyi doğrulamasına rağmen, ekonomik yükü ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi çok fazla zaman gerektirmesi bu alanda çalışan bilim insanlarını yeni arayışlara sevk etmiştir. Bu anlamda kolay, hızlı ve ekonomik bir biyomarkır daha uygun olacaktır (Murgia ve ark., 2008).

Kanser gelişimi ile MN frekansı arasındaki var olabilecek ilişki birçok araştırmada değerlendirilmiştir. Matauce ve ark. (2006)'na göre Hagmar ve ark. (1994, 1998)'nın kuzey Avrupa ülkeleri ve İtalya kohort çalışmalarında, insan periferal kan lenfositlerinde elde edilen MN frekansı ile kanser riski arasında bir ilişkinin olmadığı bildirmişlerdir. Bu çalışmalardan, MN frekansının kanserin ön habercisi olarak kullanılmayacağı sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak, çalışmanın kapsamında az veri olması elde edilen sonucun tartışmalı olmasına neden olmaktadır. Bunun yanında çalışılan populasyonların çeşitli özellikler bakımından heterojen bir yapıya sahip olması da sonuçların güvenilirliğini etkilemektedir. Bonassi ve ark. (2007) tarafından Avrupa'da yapılan kohort çalışmada, çok yüksek MN frekansına sahip olan bireylerde büyük bir olasılıkla 12-15 yıl sonra kanser gelişiminin olabileceği belirtilmiştir (Matauce ve ark., 2006).

Son yıllarda devam eden araştırmaların sonuçları bu konu ile ilgili yeni bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Çeşitli dokulardaki MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki ilişkin olduğu hipotezi, yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen birçok bulgu ile desteklenmektedir.

1. Kanser hastalarında artan MN frekansı; Daffaud ve ark. (1997), meslekleri gereği herhangi bir genotoksik ajana maruz kalmamış 198 sağlıklı erkek ve bayan ile tedavi edilmemiş 70 erkek ve kadın kanser hastasından alınan kan örneklerindeki MN frekansı incelenmiştir. Sağlıklı erkek bireylerde kendiliğinden meydana gelen MN'li hücre oranı $9,7 \pm 2,8$ bayanlarda ise $9,8 \pm 3,1$ olarak bulunmuştur. Kanser hastalarında ise kendiliğinden oluşan MN frekansı erkeklerde $21,1 \pm 15,3$ ve bayanlarda $19,1 \pm 11,2$ olarak bulunmuştur.
2. Genetik hasarlara bağlı olarak meydana gelen Bloom sendromlu bireyler, yüksek MN frekansına ve yüksek kanser riskine sahiptirler (Rosin ve German., 1985).

3. Klinik oral pre-malignansileri çeşitli kimyasallarla önleme çalışmalarında, oral mukozadaki MN frekansı kanserin bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Çalışmada, oral mukoza lezyonlu hastaların tedavi edilmeden önce ve tedaviyi takip eden 3. ve 12. aylarda MN frekansları belirlenmiştir. Kimyasal tedavi öncesi lezyonlu oral mukozadaki MN frekansı normal mukoza MN frekansından daha yüksek bulunmuştur. Ancak tedavi edildikten 3 ay sonra lezyonlu mukozadaki MN frekansı ilk duruma göre azalmıştır. Bu durum uygulanan kemoterapi ile MN oluşumunun baskılandığı ortaya çıkarmaktadır (Benner ve ark., 1994).
4. İyonize radyasyon, benzen ve tütün gibi birinci sınıf karsinojenlerin insan ve hayvanlarda MN artışına neden olduğu görülmüştür. Yani karsinojenite ile genetik hasar arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır (Sorsa ve ark., 1992).
5. Familial kutanöz malignat melanomalı (CMM) hastalardaki periferik kan lenfositleri ile fibroblastlarda yüksek MN frekansı elde edilmiştir (Weichental ve ark., 1989).
6. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında sigaradan dolayı meydana gelen akciğer kanserli hastalarda yüksek MN frekansı bulunmuştur (Cheng ve ark., 1996). Bu çalışmada 52 kontrol ve 42 vakada MN frekansları karşılaştırılmıştır. Yapılan detaylı incelemeler, sigara içen ve eskiden sigara içen akciğer kanserli hastaların istatistiksel açıdan önemli sayılacak derecede yüksek MN frekansına sahip olduğu anlaşılmıştır ($p=0,04$). Bu farklılık hiç sigara içmeyenlerde görülmemiştir.
7. Uterus servikal kanserinin ilerleyen farklı evreleri ile periferik lenfosit ve servikal epitelyum hücreleri arasında elde edilen yüksek MN korelasyonu, servikal kanser patogenezi ile MN frekansı arasında olan ilişkiyi açıklamaktadır (Leal-Garza ve ark., 2002). Bu çalışmada servikal kanser gelişiminin evreleri ile servikal epitelyum ve PBL'deki MN frekansları arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada 40 kişiden alınan örnekler değerlendirilmiş ve bu kişiler hastalık evrelerine göre 4 sınıfa ayrılmışlardır. Her iki hücre tipinde elde edilen MN frekansları ile kanser evreleri karşılaştırıldığında; 1- MN frekansı ile servikal lezyon safhaları arasında korelasyon olduğunu, 2- MN frekansı ve artan servikal kanser riski arasında pozitif lineer bir ilişki gözlemlenmiştir. Sonuç olarak MN'nin kanser riskini tahmin etmede kullanılabilir bir biyomarkır olduğu ifade edilmiştir.
8. El-Zein ve ark.(2006) tarafından yapılan çalışmada, akciğer kanser riski ile MN ve diğer CBMN biyomarkırları (NPB, NBUD) arasında kanser riski ile ilintili olarak güçlü bir kanıt olduğunu savunmuştur. Vaka - kontrol çalışması olarak yapılan bu çalışmada CBMN tekniği kullanılarak nikotine-türevli nitrosamine 4-

(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)'nin meydana getirdiği kromozomal hasarların frekansı belirlenmeye çalışılmıştır. Kendiliğinden ve NNK'nın neden olduğu kromozomal hasarlar kontrol ile karşılaştırıldığında akciğer kanseri kişilerde önemli derecede yüksek bulunmuştur. Kanser riskinin artışı ile birlikte MN, NPB ve NBUD'un frekansları sıra ile 2, 29, 6 kat artmıştır. El-Zein ve ark.(2006), çalışmada elde edilen bulgular neticesinde, CBMN tekniğinin kanser riskini tahmin etmede kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca CBMN tekniğinin NNK'nın neden olduğu genetik hasarın değerlendirilmesine son derece duyarlı olduğu belirtilmiştir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Boscalid ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları

Gıda Güvenliği Komisyonu Pestisit Uzman Komitesi (Food Safety Commission- Pesticides Expert Committee-FSC-PEC) (2004)'ne göre, Wistar sıçanları ve ICR fareler ile yapılan akut toksisite testlerinde oral olarak verilen boscalid için LD₅₀ >5000 mg/kg vücut ağırlığı bulunmuştur. Boscalidin deriye uygulanması durumunda LD₅₀ dozu >2000 mg/kg bulunmuş, inhalasyon durumunda ise 6,7 mg/L bulunmuştur. 10 erkek ve 10 dişi sıçan ile yapılan akut nörotoksikite testleri içi besin yolu ile boscalidin 0, 500, 1000, 2000 mg/kg vücut ağırlığı konsantrasyonları verilmiştir. Herhangi bir grupta nörotoksikite gözlemlenmemiş ancak birkaç erkek sıçanın tüylerinde dikleşme görülmüştür (FSC-PEC, 2004). Yeni Zelanda beyaz tavşanları ile yapılan çalışmalarda gözlerde herhangi bir iritasyona rastlanmamıştır (FSC-PEC, 2004). Benzer şekilde Guinea domuzları ile yapılan deri duyarlılık testinde herhangi bir iritasyon gözlemlenmemiştir (FSC-PEC, 2004).

10 erkek ve 10 dişi Wistar sıçan ile yapılan subkronik toksisite çalışmalarında boscalidin 0, 100, 500, 2000, 5000 ve 15 000 mg/kg konsantrasyonları denenmiştir. Belirlenen hayvan grupları, besinlere karıştırılarak 90 gün boyunca belirlenen konsantrasyonlarla beslenmişlerdir. 15 000 mg/kg verilen sıçanlarda kan trigliserid konsantrasyonu ile dişi hayvalarda dalak ağırlığında azalma gözlemlenmiştir. Dişi ve erkek sıçanların tiroit bezi ağırlığında normal vücut oranına göre artış gözlenmiştir. Ayrıca erkeklerde protrombin zamanının azaldığı, buna karşılık total protein, globülin ve total kolesterol miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. 5000 mg/kg konsantrasyonunda karaciğer ağırlığının diğer dokulara göre arttığı ve kan kalsiyum, total protein ve albümin seviyesinde artış olduğu görülmüştür. Herhangi bir etkinin gözlemlenmediği doz değerinin (No observable adverse effect level-NOAEL) 500 mg/kg olduğu belirlenmiştir (FSC-PEC, 2004).

Benzer şekilde farelerde subkronik toksisite testleri gerçekleştirilmiş ve 10 erkek ile 10 dişiden oluşan C57BL16 fareler boscalid içeren besinlerle beslenmişlerdir. Çalışmada boscalidin 0, 15, 1000, 4000 ve 8000 mg/kg konsantrasyonları denenmiş ve hayvanlar 90 gün boyunca besin yolu ile belirlenen konsantrasyonlara maruz bırakılmışlardır. 8000 mg/kg konsantrasyonunda dişilerde kan trigliserid konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. Kan total protein,

albümin ve globülin miktarında azalma görülürken erkeklerin hepatositlerinde önemli sayılacak oranda yağ miktarı değişimi gözlemlenmiştir (FSC-PEC, 2004).

5 erkek ve 5 dişi Beagle köpekleri ile yapılan kronik toksisite testlerinde, köpekler sıra ile boscalidin 0, 200, 800, 2000, 20 000 mg/kg konsantrasyonlarına besin yolu ile 12 ay süre maruz bırakılmışlardır. Bu süre sonunda yapılan değerlendirmelerde, 2000 mg/kg konsantrasyona maruz kalan erkek ve dişi köpeklerde kan klor seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Dişi köpeklerde kan alkalın fosfataz, total protein, globülin, total kolesterol düzeyinde ve tiroit ağırlığında artma gözlemlenmiştir. 2000 mg/kg ve daha yüksek konsantrasyonlarda dişi ve erkeklerin kan trigliseridlerinde artma, dişi köpek alanin transferaz miktarında ve tiroit ağırlığında artma gözlemlenmiştir (FSC-PEC, 2004).

Wistar sıçanlarla yapılan kronik toksisite testlerinde 20 erkek ve 20 dişi sıçan boscalidin 0, 100, 500, 2500 ve 15 000 mg/kg konsantrasyonlarını içeren besinlerle 24 ay beslenmişlerdir. 15.000 mg/kg boscalid verilen hayvanlarda 17. aydan itibaren bilinç kaybının meydana geldiği, 2500 mg/kg boscalid içeren besinlerle beslenen erken ve dişi sıçanların total protein, globülin, hepatosit sentrilobuler hipertrofi, tiroit foliküler hücrelerde fokal hiperplazi artışı görülmüştür (FSC-PEC, 2004).

Boscalidin 0, 100, 500, 2500 ve 15 000 mg/kg konsantrasyonlarının Wistar sıçanlarında neden olabileceği karsinojenitenin değerlendirilmesi amacıyla 50 erkek ve 50 dişiden oluşan sıçanlar 24 ay boyunca belirlenen konsantrasyonların ilave edildiği besinlerle beslenmişlerdir. 15 000 mg/kg boscalidin ilave edildiği besinlerle beslenen erkek ve dişi sıçanlarda 17. aydan itibaren bilinç kaybının başladığı ve çalışmanın sonlandırıldığı bildirilmiştir. 2 500 mg/kg konsantrasyonu içeren besinlerle beslenen erkek ve dişi sıçanlarda hepatosit sentilobüler hipertrofi ve tiroit folikül hücrelerinde hipertrofi gözlemlenmiştir. Dişilerin folikül hücrelerinde fokal hiperplazi ve tiroit ağırlığında artma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca erkeklerde total vücut ağırlığı artışında baskılanma görülmesinin yanında dişi tiroit foliküler hücrelerde adenoma gözlemlenmiştir. Genel olarak tiroit foliküler hücrelerdeki fokal hiperplazi, foliküler hücre adenoma ve foliküler hücre adenokarsinoma insidansının kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Dişilerde hiçbir etkinin gözlemlenmediği konsantrasyon değeri 100 mg/kg iken erkeklerde 500 mg/kg olarak hesaplanmıştır (FSC-PEC, 2004).

Boscalidin genotoksik aktivitesi *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle değerlendirilmiştir (Çizelge 1). Metabolik aktivasyon sistemi varlığında veya

yokluğunda bakterilerle yapılan testlerde mutajen özellik göstermediği ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde boscalidin fare kemik iliği hücrelerinde MN oluşturmadığı ve programsız DNA sentezinin meydana gelmediği görülmüştür. Kültüre edilmiş Chinese hamster hücrelerde KA'larına ve gen mutasyonlarına neden olmadığı görülmüştür (FSC-PEC, 2004).

Çizelge 1. Boscalidin çeşitli test sistemleri kullanılarak elde edilen genotoksisite sonuçları (FSC-PEC, 2004).

Test sistemleri	Hücre/Hayvan	Doz (mg/kg vücut ağırlığı)	Sonuçlar
Mikrobiyal ters mutasyon (S9 karışımı)	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535, TA1537, <i>E. coli</i> WP2uvrA	-	Negatif
Programsız DNA sentezi	Sıçan primer hepatosit kültürü	-	Negatif
<i>In vitro</i> Kromozom aberasyonu (S9 Karışımı)	Chinese hamster-hücreleri (V79)	-	Negatif
Genetik mutasyon (S9 karışımı)	Chinese hamster Ovaryum hücreleri	-	Negatif
<i>In vivo</i> Rodent mikronukleus	NMRI fareleri, 5 erkek	500, 1000, 2000 (mg/kg 24 saat ara ile peritoneal uygulama)	Negatif

2.2. Pyraclostrobin ile İlgili Yapılan Toksikite Çalışmaları

Pyraclostrobinin toksikolojik ve genotoksik özellikleri ile ilgili olarak EPA ve Pest Management Regulation Agency (PMRA) tarafından yayınlan çalışmalar dışında herhangi bir veriye rastlanmamıştır. EPA pyraclostrobinin fungusit olarak kullanılabilirliğini, çevre ve diğer organizmalar için güvenilirliği ile insan sağlığı riskine yönelik veriler yayınlamıştır. Pyraclostrobinin akut toksisitesi ile ilgili bilgiler çizelge 2'de verilmiştir.

Yapılan akut denemelerde, oral veya dermal olarak alınan pyraclostrobinin düşük toksisiteli, ancak solunum yolu ile alınan kimyasalın ise orta derecede toksik olduğu

bildirilmiştir. Kısa zamanlı maruziyet durumlarında pyraclostrobinin çalışılan deney hayvanlarındaki hedef organı onikiparmak bağırsağı olmuştur. Farelere uygulanan 30,4/40,4 mg/kg vücut ağırlığı ve daha yüksek dozlarda, onikiparmak bağırsak mukozasında incelve görülmüştür. Sıçanlara uygulanan 9,0/9,6 mg/kg vücut ağırlığı ve daha yüksek dozlarda onikiparmak bağırsağında hiperplazi, köpeklere uygulanan 12,9/13,6 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında ise onikiparmak bağırsağında mukozal hipertrofi görülmüştür. Test edilen bütün dozlarda üreme sistemi üzerine herhangi bir olumsuz etki görülmemiştir. 50 mg/kg vücut ağırlığı doza kadar sıçan fetüslerinde herhangi bir fetotoksik/teratojenik etki belirlenmemiştir.

Çizelge 2. Pyraclostrobin ile yapılan toksisite çalışmaları (EPA, 2002).

Tipi	Sonuçlar	Toksisite kategorisi
Akut oral toksisite	LD ₅₀ = > 5000 mg/kg	IV
Akut dermal toksisite	LD ₅₀ = > 2000 mg/kg	III
Akut inhalasyon toksisitesi	LC ₅₀ = < 0,31 mg/L LC ₅₀ = < 1,07 mg/L	II
Akut göz irritasyonu	En az göz irritasyonu	III
Akut deri irritasyonu	Orta derecede deri irritasyonu	III
Deri duyarlılaştırma	-	

Oral olarak radyoaktif işaretli pyraclostrobin verilen sıçanlar, verilen dozun %50'sini absorbe edebilmişlerdir. Kandaki konsantrasyon, uygulamadan 30 dakika sonra ölçülmüş, 8 veya 24 saat sonra da ikinci ölçümler yapılmıştır. Verilen dozun %74-91'i dışkı yolu ile geri kalanı ise idrar ile elimine edilmiştir. Pyraclostrobinin tekrarlı olarak verilmesi vücutta atılma yollarında bir farklılık yaratmamıştır (FAO, n.d.).

Oral veya deri yolu ile sıçanlara verilen pyraclostrobinin düşük akut toksisiteli olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda oral yola alındığında LD₅₀>5000 ve dermal olarak vücutta alındığında LD₅₀>2000 mg/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur. Solunum yolu ile alınan pyraclostrobinin orta derecede toksik olduğu ve çözücü olarak aseton kullanıldığında LC₅₀'nin 0,31-1,07 mg/l, solvesso kullanıldığında ise LC₅₀'nin 4,07-7,3 mg/l olarak bulunduğu bildirilmiştir.

Pyraclostrobin, deri ve gözleri orta derecede etkilemekte ancak deride hassaslaştırma etkisi bulunmamaktadır. Sıçanlara oral olarak verilen pyraclostrobin nefes darlığı, sendeleme, tüylerin dikleşmesi gibi klinik belirtilere yol açmıştır (FAO, n.d.).

Fare, sıçan ve köpeklere kısa süreli ancak tekrarlı olarak verilen pyraclostrobin duodenal mukozal hipertrofi ve bazı kemiricilerle yapılan çalışmalarda mide mukozasında ülser belirtileri görülmüştür. Pyraclostrobin deride ciddi tahriş meydana getirmeyen tavşanlarda uzun sürebilen tahrişler meydana getirdiği bildirilmiştir. Çalışma yapılan bütün türlerde (fare, sıçan, köpek...) vücut ağırlığında ve besin tüketiminde azalma görülmüştür (FAO, n.d.).

Kısa süreli pyraclostrobin uygulamaları sonucunda vücut ağırlığında azalmanın yanında total protein, globülin, glikoz ve trigliserid gibi kimyasal parametreler ile karaciğerde yağ depolamada azalma gözlemlenmiştir. 400 mg/ml tekrarlı dozlara maruz bırakılan rodentlerde orta derecede anemi oluşmuştur (FAO, n.d.).

In vitro çalışmalar ile *in vivo* fare kemik iliği MN testleri pyraclostrobinin genotoksik aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir. Pyraclostrobinin karsinojenik potansiyeli sıçan ve farelerde çalışılmıştır. Bir çalışmada 200 mg/kg pyraclostrobin ile beslenen sıçanlarda orta derecede hepatosellüler adenoma insidansı görülmüştür. Sıçan ve farelerde pyraclostrobinin karsinojenik potansiyeli ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır. Elde edilen genotoksik veriler ile yapılan karsinojenite çalışmaları göz önüne alındığında, pyraclostrobinin muhtemelen karsinojenik olmayacağı bildirilmiştir (FAO, n.d.).

2.3. Çeşitli Pestisitler ile İlgili Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Rencüzoğulları ve ark. (2004) etoxazolenin (5, 10 ve 20 µg/ml) *in vitro* genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla insan lenfositleri üzerine çalışmışlardır. Etoxazolenin MN (10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda), KA ve KKD oluşumlarına neden olduğu dolayısı ile genotoksik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir. Yine Guadano ve ark. (1998) tarafından, rotenoneun genotoksik aktivitesi KKD, KA ve MN yöntemleri ile insan periferik kan lenfositlerinde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre rotenonenin, MN frekansında artışa ve hücre siklusunda gecikmeye sebep olduğu ancak KKD, KA frekanslarında bir artışa neden olmadığı görülmüştür. Yüzbaşıoğlu ve ark. (2006) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, afugan fungusitinin insan periferik kan lenfositlerinde oluşturduğu KKD, KA ve MN frekansları belirlenmiştir. Afuganın 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonları önemli derecede KA oluşturmuşlardır. Benzer şekilde bütün konsantrasyonlar (2,5, 5, 10 ve 20

µg/ml) dikkate alındığında KKD ve MN frekanslarının da çözücü kontrole göre arttığı bildirilmiştir. Diğer taraftan Ribas ve ark. (1997/98), bir herbisit olan paraquatın insan periferal kan lenfositlerinde sitotoksik olduğunu ancak klastojenik veya aneujenik bir özellik göstermediğini bildirilmişlerdir.

Organoklorin pestisitler dichlorobiphenyl-trichloroetanenin (DDT) metaboliti olan 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylenein (DDE) ile hexachlorobenzenin (HCB) olası genotoksik potansiyeli *in vitro* koşullarda insan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, DDE'nin önemli derecede MN frekansında artışa neden olduğu ancak HCB'nin MN frekansında önemli bir artışa neden olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca DDE ve HCB'nin yüksek konsantrasyonları hücre bölünmesinde önemli derecede azalmaya sebep olmuştur (Ennaceur ve ark., 2008). Yine Villarini ve ark. (1998) tarafından deltamethrinin genotoksik potansiyeli *in vitro* MN tekniği, comet assay ve KKD yöntemleri kullanılarak insan periferal kan lenfositlerinde araştırılmıştır. Metabolik aktivasyonu varlığında deltamethrinin DNA hasarı oluşturduğu ancak metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda MN ve KKD frekanslarında önemli derecede artışa neden olmadığı görülmüştür. Moretti ve ark. (2002) tarafından yapılan benzer bir çalışmada terbutrynin izole edilmiş lenfositlerde (-/+ metabolik aktivasyonun) MN ve KKD frekanslarında istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmadığı ancak metabolik aktivasyonun olmadığı kültürlerde terbutrynin DNA hasarına neden olduğu comet assay ile gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, malathionun izole lenfositlerde çözücü kontrole göre MN frekansını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı, hücre bölünmesi inhibisyonu ve dolayısı ile yüksek oranda sitotoksositeye neden olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde tüm kan ile yapılan kültürlerde MN frekansı çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur (Titenko-Holland ve ark., 1997). İnsan periferal kan lenfositlerinin dışında pestisitlerin farklı hücrelerde de genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir. Carbofuran Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinde kontrole göre önemli derecede MN ve KKD frekansında artışa sebep olduğu bulunmuştur. Ticari formülasyon şekli olan furadan, KKD frekansında doza bağlı olmayan bir artışa neden olurken, MN frekansının ise sadece 50 µg/ml konsantrasyonda arttığı görülmüştür. Her iki kimyasalın hücre bölünmesinde gecikmeye neden olduğu bildirilmiştir (Soloneski ve ark., 2008).

Chauhan ve ark. (2007) tarafından, deltamethrin (DEL) ve/veya isoproturonun (ISO) genotoksik etkileri insan periferal kan lenfositlerinde ve fare kemik iliği hücrelerinde KA ve MN frekansları belirlenerek incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar DEL'in 10 µM

konsantrasyonunun önemli derecede KA'lara neden olduğu ancak 25-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda uygulanan ISO ile ISO ve DEL karışımlarının önemli etkileri olmadığı gözlenmemiştir. MN frekansı, 5 µM DEL, 100 µM ISO veya 5 + 50 µM DEL + ISO konsantrasyonlarda önemli derecede artmıştır. Diğer bir çalışmada, imidacloprid ve metalaxylinin genotoksik aktivitesi *in vitro* ve *in vivo* koşullarda KKD ve MN oluşumu ile belirlenmiştir. Pestisitlerin karışım halinde veya ayrı ayrı insan periferik kan lenfositleri ile muamele edilmesi MN frekansında önemli bir değişikliğe neden olmuştur. Imidaclopridin insan periferik kan lenfositlerinde KKD'ye neden olmadığı ancak metalaxylinin test edilen konsantrasyonlarının kontrole göre anlamlı derecede KKD frekansında artış görülmüştür. İmidacloprid ve metalaxyl ile ayrı ayrı (p<0,01) muamele edilen sıçan kemik iliği polikromatik eritrosit MN frekansında önemli derece artış görülmüştür (Demsia ve ark., 2007). Yine İla ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, cyfluthrinin genotoksik potansiyeli insan periferik kan lenfositlerinde MN, KA ve KKD oluşumları ile belirlenmiştir. Cyfluthrin ile 24 saat muamele edilen insan periferik kan lenfositlerinde önemli derecede kromozom hasarı oluşmazken 48 saat muamele süresi sonucunda önemli derecede kromozom hasarı meydana getirdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada 12 ve 24 saat süre ile cyfluthrine maruz bırakılan sıçanlarda, kemik iliği hücrelerinde önemli derecede kromozom hasarı meydana gelmiştir.

Yüzbaşıoğlu ve ark. (2008) tarafından, fluconazolenin genotoksik potansiyeli fare kemik iliğinde KA ve insan periferik kan lenfositlerinde MN, KA ve KKD ile incelenmiştir. *In vivo* KA yönteminde bütün konsantrasyonların KA'lara neden olmadığı görülmüştür. *In vitro* koşullarda uygulanan bütün konsantrasyonlara bağlı olarak MN, KKD ve KA frekanslarında çözücü kontrole göre artış olduğu ve bunun doza bağlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Fucic ve ark. (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, fluconazolenin plasenta geçişi ile oluşturacağı genotoksitenin yanında yaşa bağlı genotoksik farklılıkları ortaya koymak amacıyla ergin, genç ve yeni doğan sıçanların MN frekanslarını incelemiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında fluconazolenin ergin sıçanlarda herhangi bir DNA hasar oluşturmadıkları görülmüştür. Ancak genç ve yeni doğan sıçanlarda MN frekansının anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür.

Meslekleri gereği pestisitlere maruz kalan insan popülasyonları üzerine yapılan biyomonitöring çalışmalarda erken biyolojik hasarları göstermesi bakımından sitogenetik yöntemler olan MN, KA ve KKD ve comet gibi yöntemler tercih edilmektedir.

Pastor ve ark. (2003) tarafından, mesleki pestisit maruziyeti ile sitogenetik hasar arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmada Yunanistan, Polonya, İspanya ve Macaristan'da

pestisit uygulayan bireylerdeki lenfosit ve ağız mukoza epitel hücrelerinde MN frekansları değerlendirilmiştir. Her iki hücre tipindeki çiftçi MN frekansının kontrolden farklı olmadığı, ancak CBPI değerlerinin kontrole göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca lenfosit MN frekansının yaşa bağlı olarak değiştiği, Polonya popülasyonunun daha yüksek MN frekansına sahip olduğu bildirilmiştir. Bukkal hücre MN frekansları dikkate alındığında İspanya çiftçi popülasyonunun diğer ülke popülasyonlarına göre yüksek MN frekansına sahip olduğu görülmektedir. Bu çalışmada farklı popülasyonların pestisitlerden etkilene derecelerinin farklılığının yanında yaş, sigara gibi faktörlerin de farklı etkilerini yansıtması bakımından önemli veriler içermektedir. Elde edilen farklı sonuçlar pestisit uygulayan veya pestisitlerin bulunduğu ortamlarda çalışan farklı popülasyon verilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Pastor ve ark. (2001) Yunanistan'da çiftçilerle yaptıkları sitogenetik biyomonitöring çalışmasında biyomarkır olarak lenfosit ve bukkal hücre MN frekansları değerlendirilmiştir. Çiftçiler ve kontrol grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada MN frekansları bakımından herhangi önemli bir fark bulunmamıştır. Çalışmada ağız mukoza hücreleri MN frekansının tüketilen besinlerle değiştiği bildirilmiştir.

Costa ve ark. (2006) tarafından, tez çalışmasında değerlendirilen pyraclostrobin ile aynı kimyasal sınıfta yer alan funugistlerin de (Kresoxim-methyl) bulunduğu kompleks pestisit karışımlarına maruz kalmış çiftçilerde sitogenetik hasar belirlenmiştir. Çalışmada pestisitlere maruz kalmış 33 çiftçiden alınan periferik kan lenfositlerinde MN, KA ve KKD incelenmiştir. Çiftçilerde elde edilen MN ve KKD frekansının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bildirilmiştir ($p<0,005$). Ancak elde edilen KA frekansları karşılaştırıldığında, çiftçiler ile kontrol grubu arasında bir fark bulunamamıştır.

Costa ve ark. (2007) tarafından, meslekleri gereği pestisit karışımlarına maruz kalan bireylerin olası genetik hasarı belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada çiftçilere ait MN frekansının kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan yüksek bulunduğu bildirilmiştir ($p<0,001$). Elde edilen bu sonuçlar kapalı çalışma alanlar, koruyucu önlemlerin etkili olduğu vurgulanmıştır.

Pastor ve ark. (2002) tarafından, kompleks pestisit karışımlarına maruz kalan sera çalışanlarının sahip oldukları olası genetik hasarın belirlenmesi için 39 çiftçiden alınan periferik kan örneklerine in vitro koşullarda MN tekniği uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çiftçilerin sahip oldukları MN frekansı ile kontrol grubu MN frekansı arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Bireylerin yaşlarının elde edilen MN frekansını etkilediği bildirilmiştir.

BÖLÜM 3 MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan rapor çerçevesinde yürütülmüştür. Bu çalışmada sağlıklı bir bayan (24 yaşında) ve sağlıklı bir erkekten (28 yaşında) alınan periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD) *in vitro* MN tekniğinde kullanılacak kan örneklerinin genç, sağlıklı, sigara içmeyen, herhangi bir fiziksel ve/veya kimyasal ajana maruz kalmamış kişilerden seçilmesini önermiştir (OECD, 2007). Çalışmada genotoksik özellikleri araştırılan ve ticari olarak satılan *signum* fungusiti ile *signum*un aktif maddeleri olan boscalid ve pyraclostrobin test maddeleri olarak kullanılmışlardır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri

Lenfositlerde kromozom hasarı meydana getirmek üzere kullanılan kimyasal maddeler aşağıda anlatılmıştır.

3.1.1. Signum

Signum, suda çözünebilen ve yapısında aktif madde olarak %26,7 boscalid ile %6,7 pyraclostrobin içeren bir fungusittir. Aktif maddelere ek olarak %2,4 oranında sodium diisobutyl, naphthalene ve sulphonate içermektedir. Brüksel lahanası, beyaz lahana, karnabahar, çilek, havuç, marul ve bakla gibi meyve ve sebzelerde *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia spp.*, tarafından oluşturulan bazı hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunmasından dolayı tarımda kullanılmaktadır. Signumun fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir.

Form: Suda çözünebilen granüller şeklinde

Renk: kahverengi/kahverengimsi

Koku: Çok az kendine spesifik

Suda çözünürlüğü: Dağılabilen bir yapıda

pH: 5-7 (%1'lik süspansiyonu)

Çizelge 3. Signumun toksikolojik özellikleri (BASF, 2009).

Akut Toksikite		
Besin yolu ile alınması durumunda	Orta derecede toksik	LD ₅₀ oral (sıçan): > 200, < 500 mg/kg
Deri ile temas	Tahriş edici değildir	LD ₅₀ deri (sıçan): >2000 mg/kg
Solunum yolu ile maruz kalma	Muhtemelen herhangi bir probleme neden olmamakta	LC ₅₀ inhalasyon (sıçan) 4 saat: > 5,6 mg/L
Göz ile temas	Tahriş edici değildir	-
Hassaslaştırma	-	-

LD₅₀ = %50 öldürücü doz, LC₅₀ = %50 öldürücü konsantrasyon

3.1.2. Boscalid

Kimyasal ismi: 3-pyridinecarboxamide, 2-chloro-N-(4'chloro[1,1'biphenyl]-2-yl)

Genel ismi: Boscalid (BAS 510)

Kimyasal sınıfı: Carboxamide aka anilide

EPA Kimyasal Kodu: 128008

Chemical Abstracts Service (CAS) No: 188425-85-6

Moleküler formül: C₁₈H₁₂C₁₂N₂O

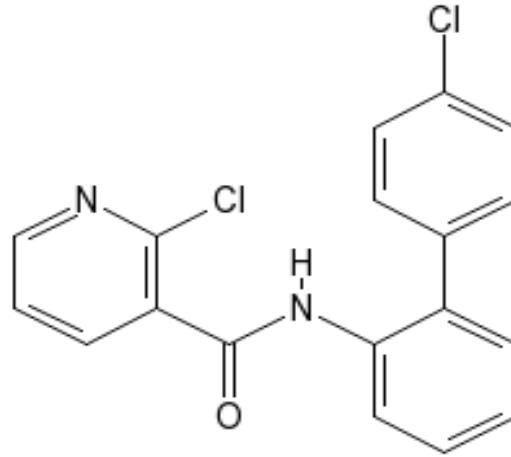
Moleküler ağırlığı: 343,21 g/mol

İlk defa Kaydedilme tarihi: 2003

Pestisit tipi: Fungusit

Üretici firma: BASF

Boscalid, carboxamide aka anilide sınıfına ait olan bir fungusittir. Mitokondrial iç zar sisteminde yer alan suksinat dehidrogenaz kompleksinin elektron transferini inhibe ederek mantarların enerji siklusuna zarar vermektedir. Boscalid, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Kore Cumhuriyetleri, Almanya ve İngiltere başta olmak üzere birçok ülkede kullanılmaktadır. Bu kimyasal 2002 yılında BASF firması tarafından geliştirilmiştir (FSC-PEC, 2004).



Şekil 11. Boscalid

3.1.3. Pyraclostrobin

Fonksiyonu: fungusit

Kimyasal isim

1- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl}(N-methoxy)carbamate

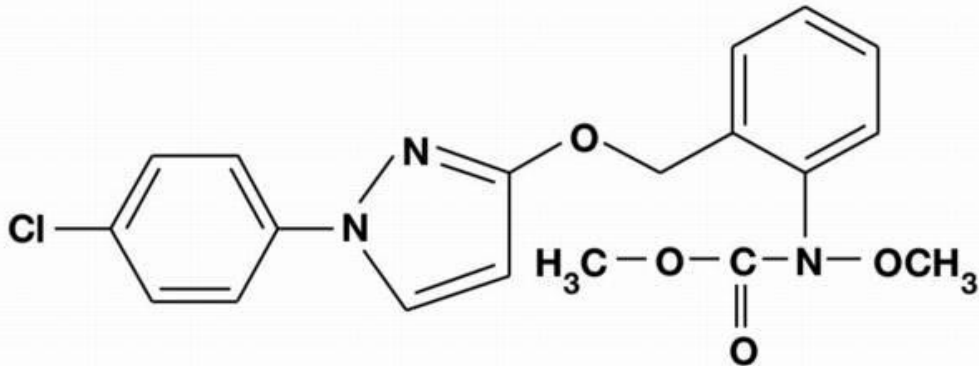
2- Chemical Abstracts Service (CAS): methyl [2-[[[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy]methyl]phenyl]methoxycarbamate

CAS no: 175013-18-0

Moleküler formül: $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$

Moleküler ağırlığı: 387,82 g/mol

Açık formülü:



Şekil 12. Pyraclostrobin

Pyraclostrobin strobilurin sınıfına ait bir fungusittir. Strobilurinler tarımsal fungusitlerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Ticari olarak satılan strobilurinler, geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler. Özellikle ascomycetes, basidiomycetes, deuteromycetes ve Oomycetes gruplarına karşı önemli derecede aktivite gösterirler. Strobilurinler çoğunlukla mantarlardan (basidiomycetes) izole edilen doğal maddelerdir. Yapısal olarak bu grubun üyelerinin ortak özelliği, yapılarında fungusitlere karşı etkili olan (E)- β -methoxyacrylat grubunun bulunmasıdır. 1996 yılında satışa sunulan strobilurinlerin 1999 yılındaki satışı yaklaşık olarak 620 milyon dolardır. Bu satış oranı kullanılan tüm fungusitlerin %10'unu oluşturmaktadır. Tahıl ürünleri, yabancı otlar, asma yaprağı, patates ve meyve, kabuklu yemiş ve sebze tohumlarında çeşitli mantar türlerinin oluşturduğu hastalıklarla mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bazı sentetik strobilurin fungusitlerde bu grubun yanında QSAR-eş-benzeri (kantitatif yapı-etki ilişkisi) gruplar vardır. Elde edilen doğal strobilurinlerin ışıқта bozdukları ve hastalıkları kontrol etmekte yetersiz oldukları görülmüştür. Yapılan çalışmalar neticesinde yapısal olarak benzer etki gösteren kimyasallar sentezlenmiştir. Elde edilen sentetik strobilurinlerin ışığa duyarlı ve fungusit aktivitelerinin güçlü olması sağlanmıştır. Bunlar arasında yer alan pyraclostrobin BASF firması tarafından 2000 yılında geliştirilmiş ve 2002 yılında piyasaya sürülmüştür.

3.1.4. Pyraclostrobinin Etki Tarzı

Strobilurinler mitokondrinin spesifik bir bölgesine bağlanırlar. Bu bölge sitokrom b'nin quinol oksidasyon (Qo) bölgesidir. Sitokrom b diğer ökaryot ve mantarların iç mitokondrial zarlarına yerleşmiş olan sitokrom bc1 kompleksinin bir parçasıdır. Bu bölgeye bir inhibitörün bağlanması durumunda sitokrom b ve sitokrom c arasında elektron taşınımı engellenmiş olmaktadır. Bu durum nikotinamid adenine dinukleotid (NADH)'ın oksidasyonu ve ATP sentezinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuçta enerji üretimi durmakta ve mantar ölmektedir (Balba, 2007). Strobilurinler ile yapılan çalışmalarda mantarların spor bölünme safhaları ve zoospor dönemlerinde bu kimyasallara karşı daha duyarlı oldukları bulunmuştur. Çok fazla miktarda enerji gerektiren bu safhalardaki mantarlara daha fazla etkili oldukları bildirilmiştir.

3.1.5. Mitomisin C (Mitomycine-MMC)

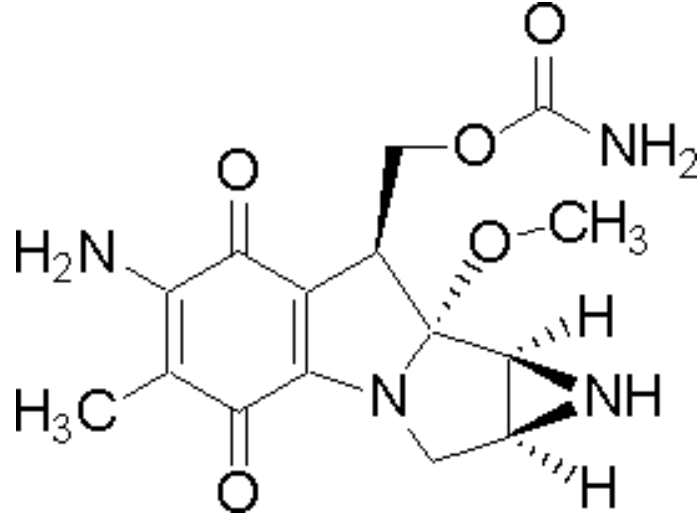
Mitomisin C bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kapalı formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

Molekül ağırlığı: 334,33 g/mol

CAS No: 50-07-7

Sigma ürün no: M4287



Şekil 13. Mitomisin C

3.1.6. Dimetil Sulfoksit (DMSO)

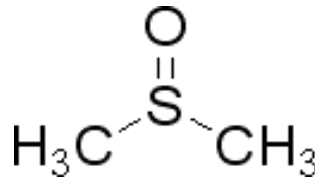
Dimethyl sulfoxide bu çalışmada boscalid ve pyraclostrobin için çözücü ortam olarak kullanılmıştır.

Kapalı Formülü: $(CH_3)_2SO$

Molekül ağırlığı: 78.13 g/mol

CAS No: 67-68-5

Sigma Ürün No: D2650



Şekil 14. Dimetil Sulfoksit

3.1.7. Sitokalsin B (Cytochalasin B)

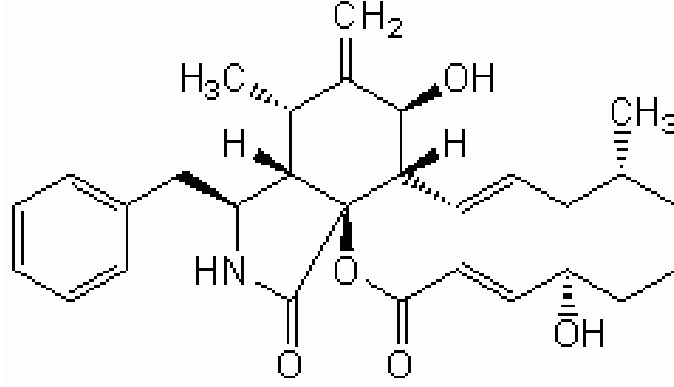
Sitokalsin-B, bu çalışmada bölünen hücrelerin sitoplazma bölünmesini durdurarak hücrelerin BN olarak kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. CBMN tekniğinde sitokalsin-B'nin 3-6 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda kullanılması önerilmiştir. Yüksek konsantrasyonda kullanılan sitokalsin-B'nin MN frekansını artırdığı bildirilmiştir. Tez

çalışmasında sitokalsin-B'nin kültür ortamında konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır.

Kapalı Formülü: C₂₉H₃₇NO₅

CAS No: 14930-96-2

Sigma Ürün No: C6762



Şekil 15. Sitokalsin B

3.1.8. Fitohemagglutinin (Phytohaemagglutinin-PHA-M)

PHA-M hücre siklusu G₀ fazında bulunan hücreleri mitoz bölünmeye sevk etmek için kullanılmıştır. Çalışmada ana stok 5 ml besiyeri (RPMI 1640) ile çözülmüş ve bu stoktan her kültür ortamına 0,2 ml eklenmiştir.

3.1.9. Hipotonik Çözelti

0,075 Molar Potasyum Klorür (KCl) hipotonik çözelti olarak kullanılmıştır. Her preparasyondan 1 saat önce taze olarak distile su ile hazırlanan çözelti buzdolabında +4 °C'de bekletilmiş ve deney sırasında bu sıcaklıktaki çözelti kullanılmıştır.

3.1.10. Fiksatif

Fiksatif olarak 7 hacim metanol (Merck, ürün no:106007) ile 1 hacim glasiyal asetik asit (Merck, ürün no: 100063) karışımı kullanılmıştır. Fiksasyon aşamasında kullanılan karışım taze olarak hazırlanmış ve deney sırasında +4 °C karışımı kullanılmıştır.

3.1.11. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından temin edilmiş olup, %5'lik çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.12. Sorenson Tamponun Hazırlanması

Sorenson tamponu, %5'lik Giemsa boyanın hazırlanması için kullanılmıştır. 100 ml distile su içerisine 0,2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ile 0,1 gr KH_2PO_4 kullanılarak hazırlanmıştır (pH = 6,9).

3.1.13. Entellan

Hazırlanan preparatların kaplanması için kullanılmıştır.

3.1.14. Lamların Temizlenmesi

Lamlar, %2'lik HCl asit çözeltisinde 1 saat bekletilmiş ve bu süre sonunda akan musluk suyunda durulanmışlardır. Daha sonra 5 defa distile su ile durulanan lamlar etüvde kurutularak -20°C sıcaklıkta bekletilmiştir.

3.1.15. Sterilizasyon

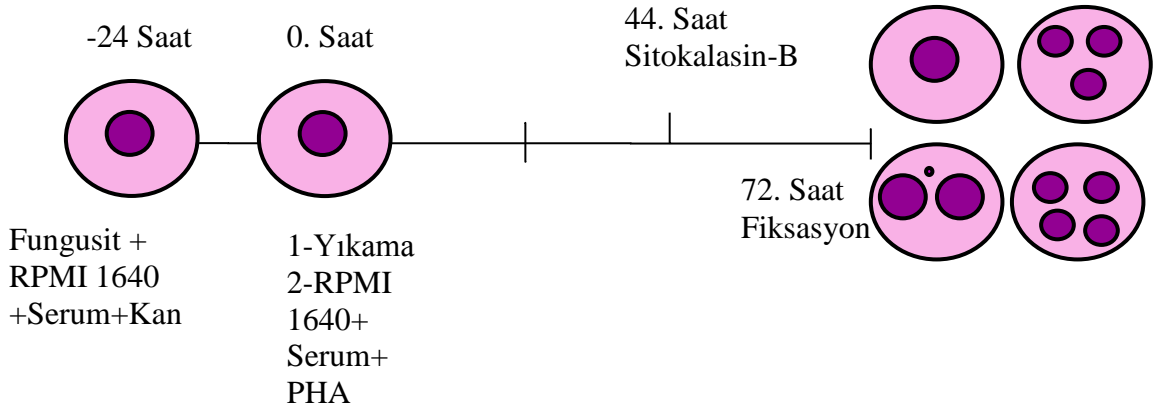
Çalışmada kullanılan tüpler, pipet uçları, ara stok hazırlamak için gerekli olan şişeler NÜVE marka otoklavda deney öncesi steril edilmiş ve ağzı kilitli poşetlerde saklanmışlardır.

3.1.16. MN Tekniği ve Lenfositlerin Fungusitler ile Muamelesi

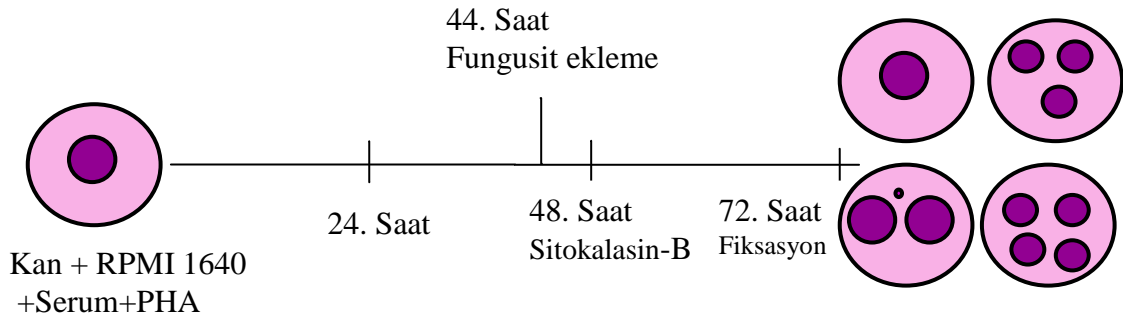
In vitro koşullarda hazırlanan lenfosit kültürü Fenech ve Morley (1985) tarafından geliştirilen yöntemin mevcut laboratuvar şartlarına uygun hale getirilmesi ile uygulanmıştır. Kan örnekleri (15-20 ml) heparinli tüplere alınmış ve oda sıcaklığında 3-4 saat bekletildikten sonra kültüre edilmişlerdir. Hücre kültürü yapılmadan önce, laboratuvarın kullanılan bütün yüzeyleri %70'lik etil alkolle, zemini ise sodyum hipoklorit ile temizlenmiştir. Ayrıca laboratuvarında bulunan ultraviyole (UV) lambalar açılarak 5-6 saat süre ile gerekli aseptik şartlar sağlanmıştır. Yapılan ön denemeler, bu koşullar altında laboratuvarında herhangi bir mikroorganizma kontaminasyonunun olmadığını göstermiştir.

Çalışmada değerlendirilen bütün fungusit konsantrasyonlar için hazırlanan deneyler ve deney tekrarları için; steril kültür tüplerine 0,5 ml kan örneği, 4 ml besiyeri (RPMI 1640, Sigma-R8758) ve 1 ml newborn calf serum (Sigma N4637) eklenmiştir. Genotoksik etkisi değerlendirilen kimyasallar iki farklı zamanda kültüre eklenmiştir. G_0 (dinlenme) fazında bulunan lenfositlerin signum, boscalid ve pyraclostrobinin çeşitli konsantrasyonlarına olan genotoksik cevaplarının değerlendirilmesi amacıyla fungusitler 24 saat süre ile kültür ortamında bırakılmışlardır (Fenech, 2007) (Şekil 16). Bu sürenin

sonunda genotoksisitesi değerlendirilen fungusitler aşağıda belirtilen şekliyle ortamdan uzaklaştırılmışlardır. Hücreler steril şartlarda 1200 rpm de santrifüj edilmiş ve 3 defa RPMI 1640 ile yıkanarak supernatantları atılmıştır. En son yıkamadan sonra, hücreler tekrar 4 ml besiyeri ve 1 ml serum ile tekrar kültüre alınmış ve bu aşamada 0,2 ml PHA-M eklenerek hücreler mitozu sevk edilmişlerdir. Hücrelerin kültüre alınmasından 44 saat sonra ise kültür ortamındaki konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B eklenmiş ve hücre kültürü 72. saatin sonunda sonlandırılmıştır. Signum, boscalid ve pyraclostrobinin siklusa ilerleyen (bir hücre siklusunu tamamlayan) lenfositlerde oluşturdukları genotoksisitenin değerlendirilmesi için; başlangıçta kültür ortamına 0,5 ml kan, 4 ml besiyeri ve 1 ml serum ile birlikte PHA-M ve çalışılan kimyasalların belirlenen miktarları eklenmiştir (Şekil 17). 48. saate kültür ortamındaki konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B eklenmiş ve hücre kültürü 72. saatin sonunda sonlandırılmıştır (Fenech, 2007). Yapılan her deneyde, kimyasalların test edildiği kültürler ile birlikte çözücü kontrol ve kültür şartları etkinliğinin belirlenmesi için ise pozitif kontrol hazırlanmıştır. 72. saatin sonunda hücreler 7 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatantları ayrı pastör pipetleri kullanılarak atılmıştır. Sıfır ile +4⁰C arasındaki KCl'den her kültür tüpüne 7 ml damlatılmış ve 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Bu aşamadan sonra süpernatantları atılmış ve soğuk olan metanol-glasial asetik asit karışımından damla damla tüplere eklenmiş ve hücreler 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmişlerdir. Bu aşama 3 defa tekrarlanmış ve en son aşamada tüpün dibinde kalan lenfositler pipetaj yapılarak buz soğukundaki lamaların üzerine damlatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve daha sonra hazırlanan %5'lik Giemsa boya ile 6-7 dakika boyanmışlardır. Boyama işleminden sonra preparatlar oda sıcaklığında kurutulmuş, entellan kullanılarak lamelle kapatılmış ve mikroskopta sayıma hazır hale getirilmişlerdir.



Şekil 16. Fungusitlerin G₀ fazı lenfositleri ile muamele protokolü (Fenech, 2007)



Şekil 17. Fungusitlerin siklusta ilerleyen lenfositler ile muamele protokolü (Fenech, 2007)

Çizelge 4. Araştırmada G₀ ve siklusta ilerleyen lenfosit hücelere uygulanan signum, boscalid ve pyraclostrobin konsantrasyonları (µg/ml).

G ₀ fazı lenfositleri						Siklusta ilerleyen lenfositler					
Signum		Boscalid		Pyraclostrobin		Signum		Boscalid		Pyraclostrobin	
Bayan	Erkek	Bayan	Erkek	Bayan	Erkek	Bayan	Erkek	Bayan	Erkek	Bayan	Erkek
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,75	0,75
2	2	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1	1
6	6	6	6	2	2	2	2	2	2	1,5	1,5
8	8	8	8	3	3	3	3	3	3	2	2
25	25	25	25	4	4	4	4	4	4	3	3
75	75	75	75	6	6	6	6	6	6	4	4
100	100	100	100	8	8	8	8	8	8	6	6
200	200	150	150	25	25	-	-	-	-	8	8
-	-	200	200	-	-	-	-	-	-	-	-

3.1.17. CBPI'nin Belirlenmesi

Kimyasalların genotoksik özelliklerinin çalışıldığı *in vitro* şartlarda hücrelerin, uygulanan konsantrasyonlar karşısında bölünebilme yetenekleri, hücre siklusunda gecikme veya meydana gelen hücre ölümlerinin derecesinin ölçülmesi gerektiği bildirilmiştir (Kirsch-Volders ve ark., 2003). Sitokalsin-B'nin kullanıldığı çalışmalarda hücrelerin proliferasyon potansiyelleri CBPI ile belirlenmektedir. Bu çalışmada lenfosit kültür ortamına eklenen signum, boscalid ve pyraclostrobinin uygulanan konsantrasyonları için CBPI aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir (Eastmond ve Tucker, 1989). Her bir konsantrasyon değeri için en az 500 hücre değerlendirilmiştir.

$$CBPI = (1 \times MI + 2 \times MII + 3 \times MIII + 4 \times MIV) / N$$

(M1: bir nukleuslu, M2: iki nukleuslu, MIII: üç nukleuslu, MIV: dört nukleuslu hücre sayısı, N: sayılan toplam hücre sayısını göstermektedir (Şekil 18)).

3.1.18. Lenfositler

Periferel kan lenfositlerin büyük çoğunluğu hücre siklusunun dinlenme evresi olarak bilinen G₀ evresinde bulunurlar. Bu hücreler, *in vitro* ortamda *Phaseolus vulgaris*'den elde edilen ve bir protein olan PHA-M tarafından mitotik bölünmeye sevk edilirler. İnsan periferel kan lökositlerinin *in vitro* koşullarda PHA-M kullanılarak mitoz sevk edilmesi ilk defa Nowell tarafından gösterilmiştir. Sahip olduğu mitojen özelliği nedeni ile T lenfositlerinin büyük çoğunluğunu mitoz bölünme için uyarmaktadır. *In vitro* koşullarda PHA-M ile muamele edildikten sonra lenfositler blastoid hücrelere dönüşmekte, nükleus ve tüm hücre hacmi artmaktadır. Mitojen stimülasyonundan 48 saat sonra hücre hacmi ilk durumuna göre yaklaşık 5 kat artmaktadır (IAEA, 2001).

3.1.19. Çözücü ve Pozitif Kontrollerin Belirlenmesi

MN oluşumunu incelemek için nükleus bölünmesinin hem kontrollerde hem de kimyasal ile muamele edilen hücrelerde meydana gelmesi gerekmektedir. OECD (2007), kimyasalların genotoksik potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmalarda pozitif ve çözücü kontrolün gerekliliğini bildirmiştir (OECD, 2007). Bu çalışmada genotoksik özellikleri değerlendirilen *signum fungusiti* besiyeri ile *boscalid* ve *pyroclastrobin* aktif maddeleri ise DMSO ile çözülmüşlerdir. Dolayısı ile çalışmada *signum* ile yapılan deneylerde besiyeri, *boscalid* ve *pyraclostrobin* ile yapılan deneylerde ise DMSO çözücü ortam olarak kullanılmıştır. *Boscalid* ve *pyraclostrobin* ile yapılan çalışmalarda çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO'un kültür ortamındaki miktarı %1 oranından daha az olacak şekilde (0,03 ml) eklenmiştir.

Kültür şartlarının, planlanan çalışma için uygun olup olmadığı, bir kimyasalın genotoksikite oluşturup oluşturmayacağı MMC kullanılarak test edilmiştir. MMC daha önce yapılan birçok çalışmada kromozom hasarı oluşturduğu bilinen bir kimyasaldır. Dolayısı ile bu çalışmanın pozitif kontrolü olarak MMC seçilmiş ve yapılan ön denemelerde MMC'nin laboratuvar şartlarımızda kontrole göre anlamlı derecede MN oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Kültür ortamındaki konsantrasyonları 0,01 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml olacak şekilde farklı lenfosit kültürlerine MMC eklenmiş ve değerlendirme sonucunda çözücü kontrole (distile su) göre anlamlı derecede MN oluşumunun 0,05 µg/ml'de olduğu görülmüştür. Kontrolde elde edilen MN frekansı %0,2 iken 0,05 µg/ml MMC bulunan kültürlerde bu değer %7-10 olarak bulunmuştur. Çalışmanın bütün denemelerinde MMC'nin belirlenen bu konsantrasyonu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.20. Hücre Kültürü Tekrarı

Her bir donör ve her bir konsantrasyon için birbirinin tekrarı olan iki deney hazırlanmıştır.

3.1.21. Değerlendirilen Hücre Sayıları

Kirsch-Volders ve ark. (2003), sitokalsin-B'nin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda belirlenecek olan CBPI için 500 hücrenin sayılmasını önermiştir. Böylelikle çalışmada değerlendirilen her bir konsantrasyon için bir nukleuslu, iki nukleuslu, üç ve dört nukleuslu olan hücrelerden en az 500 hücre sayılmıştır. Ayrıca çalışmada sitokalsin-B'nin kullanıldığı *in vitro* kültürlerde MN frekansının belirlenmesi için 2000 BN hücrenin (her kültür için 1000 BN, her konsantrasyon için 2 kültür) sayılması gerektiğini belirtilmiştir. Tez çalışması kapsamında her bir konsantrasyon ve her bir donör için 2000 hücre sayılmıştır.

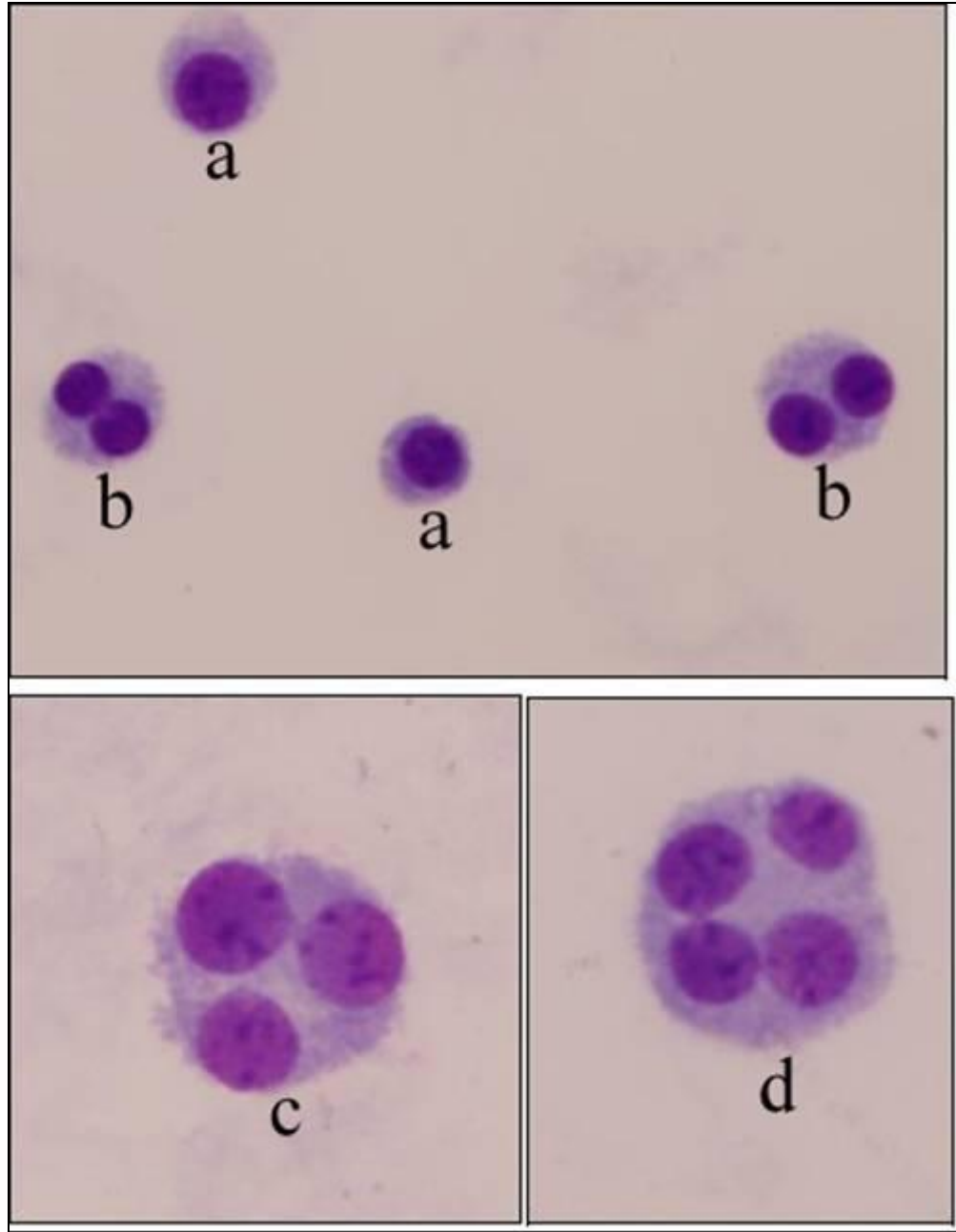
3.1.22. Deney Tekrarları

Lenfositlerin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda her bir deney için sağlıklı (< 35 yaş), sigara içmeyen iki farklı donörün kullanılması önerilmiştir (Kirsch-Volders, 2003). Tez çalışmasında bir kadın (24 yaş) ve bir erkekten (28 yaş) alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

3.1.23. MN Frekansının Belirlenmesi

Çalışmada preparatların boyanması işleminde giemsa kullanılmış ve MN, NPB, NBUD ve CBPI için hücre sayımları 1000X büyütme ile yapılmıştır. Çalışmada Zeiss binoküler marka mikroskop kullanılmıştır. Bütün preparatlar tek bir kişi tarafından sayılmış, dolayısı ile farklı kişilerin sayımlarından kaynaklanabilecek hatalar ortadan kaldırılmıştır. Analizden önce preparatlara farklı kodlar verilmiş böylelikle preparatı değerlendiren kişinin konsantrasyon değerlerinden etkilenmemesi sağlanmıştır. Çalışmada her bir pestisit denenen konsantrasyonları iki defa kültüre edilmişlerdir. Böylece bir donörden alınan kan örnekleri ile bir konsantrasyon iki defa denenmiştir. Her konsantrasyon değeri için 1000 binükleat hücre sayılmış ve bu hücrelerde MN frekansı belirlenmiştir. Bir kişiye ait kan örneklerinde, bir konsantrasyon için 2000 BN hücre değerlendirilmiştir. MN'u olmayan, 1 tane olan, 2 tane veya daha fazla olan binükletler belirlenmiştir. Fenech (2000)'e göre sağlıklı bir bireyde bir hücrede 0-3 arasında MN bulunabilir. Fakat maruz kaldığı genotoksik ajana bağlı olarak bu sayının 3'ten fazla olabileceği belirtilmiştir. MN sayımları yapılırken beraberinde 1000 BN hücrede bulunan

NPB ve NBUD sayıları da belirlenmiştir. En az 500 hücre sayılarak 1, 2, 3, 4' lü hücre sayısı belirlenmiş ve bu sayılardan yola çıkarak CBPI hesaplanmıştır.



Şekil 18. CBMN tekniği sonucu oluşan hücre çeşitleri. a: tek çekirdekli, b: çift çekirdekli, c: üç çekirdekli, d: dört çekirdekli hücreler

3.1.24. Değerlendirilen Çift Çekirdekli Hücrelerin (BN) Özellikleri

Çalışmada BN'lar değerlendirilirken Fenech (2000) tarafından önerilen kriterler dikkate alınmıştır. Buna göre;

1. Değerlendirilen hücreler BN olmalıdır,

2. BN hücre içindeki nukleusların bozulmamış bir çekirdek olmalı ve aynı sitoplazmik sınırlar içerisinde olmalıdır,
3. BN hücre içindeki her iki nukleus aynı boyutlarda olmalı, aynı boyanma şekline ve yoğunluğuna sahip olmalıdır,
4. BN hücre içindeki her iki nukleus bazı durumlarda ince bir NPB ile birbirine bağlı olabilir. Bu köprünün kalınlığı nukleus yarıçapının $\frac{1}{4}$ 'ünden daha kalın olmamalıdır,
5. BN hücre içindeki her iki nukleus sınırları birbirine değebilir. Ancak ideal olanı nukleusların üst üste düşmemesidir. Eğer üst üste düşen nukleusların sınırları açık bir şekilde belli ise BN sayılmalıdır,
6. Sitoplazmik sınır veya bir BN hücrenin zarı tam olmalı veya bu zar diğer komşu hücrelerin zarlarından ayırt edilebilmelidir (Fenech, 2000).

3.1.25. Sayılan Mikronukleusların Özellikleri

- 1- İnsan lenfositlerinde bulunan bir MN'nin çapı, ana nukleusların ortalama çapı ile karşılaştırıldığında; $\frac{1}{16} < X < \frac{1}{3}$ aralığında olmalıdır. Görüntü alanı bakımından bir MN, bir ana nukleus alanının $\frac{1}{256}$ 'sı ile $\frac{1}{9}$ 'u arasında bir alana sahip olmalıdır,
- 2- MN'ler ışığı geri yansıtıcı olmamalıdır,
- 3- MN'ler ana nukleuslara bağlı olmamalıdır,
- 4- MN'ler ana nukleusa bir noktada değebilir ancak ana nukleusun üstüne düşmemelidir. MN sınırları ana nukleusların sınırlarından ayırt edilebilmelidir,
- 5- MN'ler genellikle ana nukleuslarla benzer boyanma özellikleri gösterirler.

3.1.26. NPB Sayma Kriterleri

Nukeloplazmik köprüler klastojen özelliği gösteren ajanlara maruz kalındığında oluşabilmektedirler. NPB'ler BN hücre içindeki iki nukleusu birbirine devamlı olarak bağlayan ve anafazda oluşan disentrik kromozomun zıt kutuplara çekilmesi sonrasında oluştuğu düşünülmektedir. NPB'lerin kalınlığı ana nukleusun yarıçapının $\frac{1}{4}$ 'ünden fazla olmamaktadır. NPB'ler ana nukleusla aynı boyanma özelliği göstermelidirler. Çok nadir olmakla birlikte bir BN hücrede birden fazla NPB gözlemlenebilir. Çoğunlukla NPB içeren bir BN hücrede bir veya daha fazla MN bulunabilmektedir (Fenech, 2000).

3.1.27. NBUD Sayma Kriterleri

NBUD amplifiye edilmiş DNA ve DNA tamir komplekslerinin nukleus tarafından eliminasyonu sonucu oluşan yapılardır. Tez çalışmasında değerlendirilen NBUD'lar, Fenech (2007) tarafından belirlenen kriterlere göre değerlendirilmiştir. NBUD'lar görünüş olarak MN'lere benzerler. Ancak yarıçapı çoğu zaman nukleoplazmik tomurcuğun yarıçapından daha az olan bir sapla veya elimne edilme sürecinin safhasına göre oldukça ince bir sapla ana nukleusa bağlı olarak görünürler. NBUD, MN'la aynı boyanma özellikleri gösterirler (Fenech, 2007).

3.1.28. Toksisitenin Belirlenmesi ve Doz Aralıkları

Kirsch-Volders ve ark. (2003) ve Lorge ve ark. (2007), sitokalsin-B'nin kullanıldığı çalışmalarda sitotoksisitenin CBPI kullanılarak belirlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla tez çalışmasında çözücü kontrol ve pestisitler ile muamele edilen kültürden elde edilen CBPI sonuçları göz önüne alınarak sitotoksisiteler belirlenmiş ve toksisiteleri hesaplanmıştır. Ayrıca, Kirsch-Volders ve ark. (2003) bir kimyasal için en az üç konsantrasyonun denenmesi gerektiğini ve iki konsantrasyon arasında en fazla $\sqrt{10}$ kat fark bulunacağını bildirmiştir. Çalışmada konsantrasyonlar seçilirken bu kriter dikkate alınmıştır.

$$\% \text{ Cytostasis} = 100 - 100 \left\{ \frac{(CBPI_T - 1)}{(CBPI_C - 1)} \right\}$$

T = Test edilen kimyasal ile muamele kültür

C = Çözücü kontrol

3.1.29. İstatistiksel Analiz

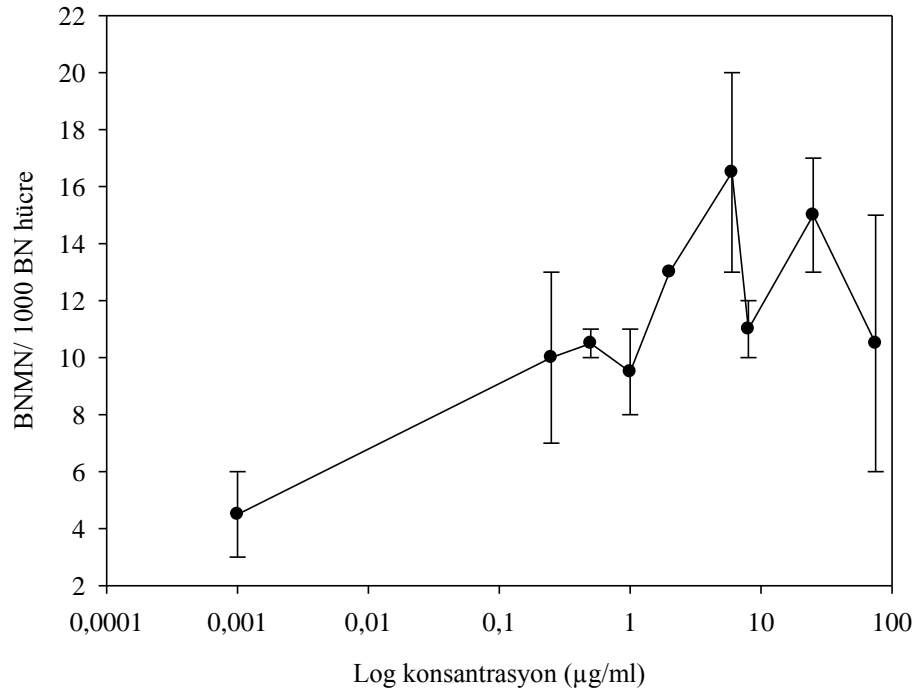
Fungusit konsantrasyonları ile oluşan gentoksisite ve sitotoksisite arasındaki ilişkiyi belirlemek için lineer regresyon analizi ve korelasyon katsayıları belirlenmiştir. Her bir konsantrasyonun lenfositlerde oluşturduğu MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile çözücü kontroleden elde edilen frekanslara göre istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı parametrik olmayan Kruskal Wallis ve daha sonra Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca herbir konsantrasyon için elde edilen CBPI değerleri ile çözücü kontrole ait CBPI değerlerini karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi daha sonra Dunnet's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır (GraphPad Prism 5). Cinsiyetler arasında istatistiksel bir farkın olup olmadığı Mann Whitney U testi

kullanılarak saptanmıştır. Ayrıca her bir donör için yapılan iki deney arasında fark olup olmadığı Wilcoxon eşleştirilmiş testi (Wilcoxon Signed Ranks Test) ile belirlenmiştir.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Bulgular****4.1.1. Signumun G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite****4.1.1.1. Signumun Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite**

Signumun, hücre siklusu G₀ fazında bulunan insan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu MNL, BNMN, NPB ve NBUD frekansları çizelge 5’de verilmiştir. Çizelgede ayrıca CBPI ile hücre gelişiminin durdurulması veya engellenmesini (cytostasis) gösteren oranlar da verilmiştir. Signumun 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edilen kültürlerde yeterli sayıda binükleat hücre elde edilemediği için çalışmada değerlendirilmeye alınmamışlardır. Değerlendirilen bütün konsantrasyonlara karşılık oluşan MNL ve BNMN frekanslarının çözücü kontrole göre arttığı görülmüştür (Şekil 18). Ancak bütün konsantrasyonlar için elde edilen MNL ve BNMN frekansları pozitif kontrolde elde edilen değerler kadar yüksek bulunmamıştır. Yapılan her iki deney sonucunda, bazı signum konsantrasyonlarının BN hücrelerinde bir veya birden fazla MN oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Lineer regresyon analizine göre her iki deneyin BNMN frekansları göz önüne alındığında konsantrasyona bağlı bir artış saptanmamıştır. Elde edilen BNMN frekanslarına uygulanan Wilcoxon eşleştirilmiş testi (Wilcoxon Signed Ranks Test), yapılan iki deney arasında istatistiksel olarak fark olmadığını göstermiştir (p=0,09).

Bütün konsantrasyonlar göz önüne alındığında NPB ve NBUD frekanslarında çözücü kontrole göre anlamlı artışlar görülmemiştir. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak CBPI’de azalma meydana gelmiştir. CBPI ile konsantrasyon arasında negatif korelasyon (R=-0,60) bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p>0,05). Muamele edilen konsantrasyonlar ile çözücü kontrolden elde edilen CBPI değerleri göz önüne alındığında, 75 µg/ml signumun lenfosit kültürde %54,9 oranında sitotoksisite oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 19. Signumun bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH)

Çizelge 5. Signumun bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

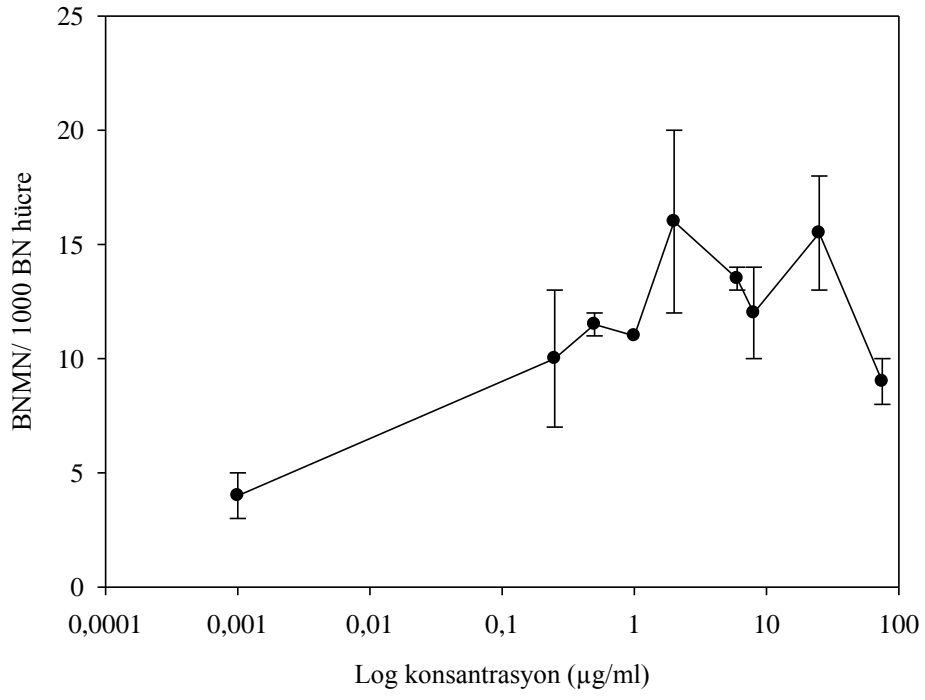
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	157	3	0	0	0	163	81,5±1,50	160	80,0±1,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	-	-
RPMI 1640	7	2	0	0	0	11	5,50±2,50	9	4,50±1,50	2000	0,50±0,50	0,00±0,00	1,57±0,03	-
0,25	18	1	0	1	0	24	12,0±2,00	20	10,0±3,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,43±0,06	24,8
0,5	18	3	0	0	0	24	12,0±1,00	21	10,5±0,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,39±0,04	30,9
1	19	0	0	0	0	19	9,50±1,50	19	9,50±1,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,36±0,03	35,7
2	24	0	2	0	0	30	15,0±2,00	26	13,0±0,00	2000	1,00±0,00	0,50±0,50	1,34±0,02	39,8
6	31	2	0	0	0	35	17,5±3,50	33	16,5±3,50	2000	0,50±0,50	0,50±0,50	1,31±0,01	45,3
8	21	0	0	1	0	25	12,5±0,50	22	11,0±1,00	2000	0,50±0,50	0,00±0,00	1,35±0,05	37,4
25	27	3	0	0	0	33	16,5±2,50	30	15,0±2,00	2000	0,50±0,50	1,50±1,50	1,28±0,03	50,4
75	20	1	0	0	0	22	11,0±5,00	21	10,5±4,50	2000	1,00±1,00	0,50±0,50	1,25±0,04	54,9

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.1.2. Signumun Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Signumun bütün konsantrasyonları, erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumuna neden olmuştur (Çizelge 6). Test edilen herbir konsantrasyonun neden olduğu MNL ve BNMN frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada 100 ve 200 µg/ml signum ile muamele edilen kültürlerde yeterli sayıda BN hücresi elde edilememiştir. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında MNL ve BNMN frekanslarının test edilen yüksek konsantrasyonlarda azaldığı görülmüştür (Şekil 20). Sonuçlara uygulanan lineer regresyon analizi, signumun artan konsantrasyonlarına bağlı olarak MNL ve BNMN frekanslarında lineer bir artış olmadığını göstermiştir. Wilcoxon eşleştirilmiş testi BNMN bakımından paralel olarak yapılan iki deney arasında fark olmadığını göstermiştir (p=0,23).

Signum ile muamele edilen G₀ fazı lenfositlerinde NPB ve NBUD oluşumu gözlenmiştir. Test edilen bazı konsantrasyonlarda NPB ve NBUD frekansları çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur. NPB ve NBUD frekanslarında meydana gelen artışların dozla birlikte lineer bir şekilde artmadığı görülmüştür. Bununla birlikte signumun artan konsantrasyonları CBPI değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Lineer regresyon analizi konsantrasyon artışı ile CBPI değerlerindeki azalmanın lineer ve istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (R²=-0,54, p<0,05). Muamele edilen kültürler ile çözücü kontrolden elde edilen CBPI değerleri göz önüne alındığında 75 µg/ml signumun lenfosit kültürde %61,5 sitotoksisite oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 20. Signumun erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 6. Signumun erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

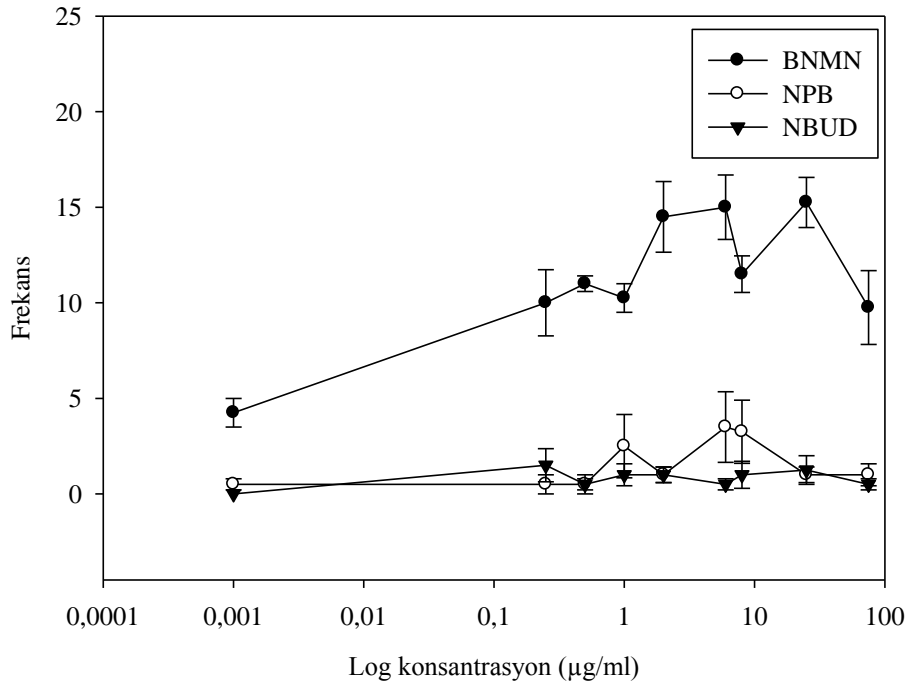
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	112	3	0	0	0	118	59,0±10,0	115	57,5±9,50	2000	0,05±0,50	0,00±0,00	-	-
RPMI 1640	7	1	0	0	0	9	4,50±1,50	8	4,00±1,00	2000	0,05±0,50	0,00±0,00	1,70±0,03	-
0,25	19	1	0	0	0	21	10,5±3,50	20	10,0±3,00	2000	1,00±1,00	3,00±0,00	1,57±0,05	18,9
0,5	19	3	1	0	0	28	14,0±3,00	23	11,5±0,50	2000	1,00±0,00	1,00±1,00	1,53±0,06	23,3
1	19	0	3	0	0	28	14,0±1,00	22	11,0±0,00	2000	5,00±2,00	2,00±0,00	1,45±0,09	35,6
2	30	2	0	0	0	34	17,0±3,00	32	16,0±4,00	2000	1,00±1,00	1,50±0,50	1,45±0,07	35,9
6	24	1	1	1	0	33	16,5±2,50	27	13,5±0,50	2000	6,50±1,50	0,50±0,50	1,48±0,02	31,1
8	22	1	1	0	0	27	13,5±0,50	24	12,0±2,00	2000	6,00±1,00	2,00±1,00	1,40±0,04	42,9
25	25	5	0	0	1	40	20,0±6,00	31	15,5±2,50	2000	1,50±0,50	1,00±1,00	1,37±0,03	46,6
75	18	0	0	0	0	18	9,00±1,00	18	9,00±1,00	2000	1,00±1,00	0,50±0,50	1,27±0,01	61,5

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

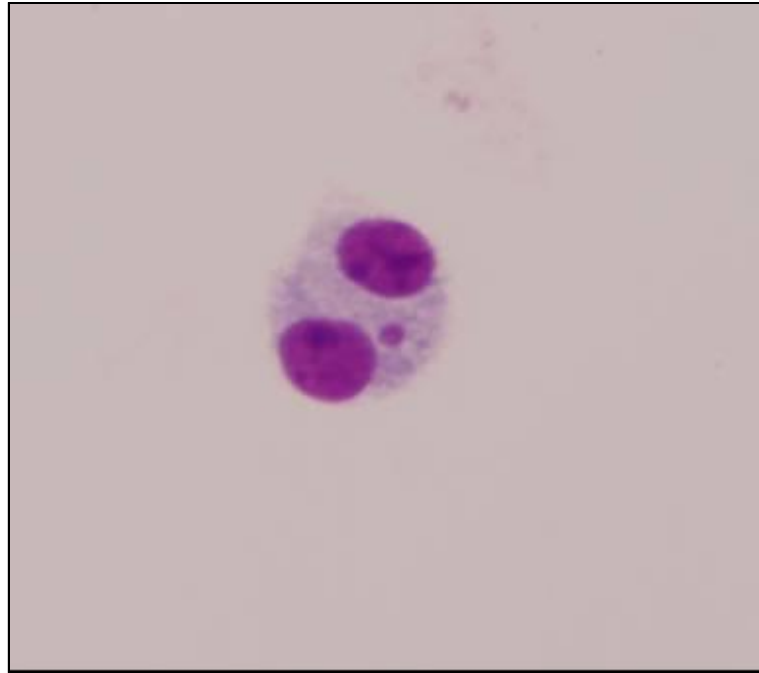
4.1.1.3. Signumun İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Ticari olarak satılan signum fungusinin G₀ fazında bulunan insan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisitenin değerlendirilmesi için 4000 BN hücre sayılmış ve değerlendirilen parametrelere ilişkin elde edilen veriler çizelge 7'de verilmiştir. Signumun her bir konsantrasyonunun neden olduğu MNL ve BNMN frekansları çözücü kontrolden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 21). Bununla birlikte bazı hücrelerde birden fazla MN oluştuğu görülmüştür. Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında MNL ve BNMN frekanslarının konsantrasyona bağlı lineer bir artışının olmadığı saptanmıştır. Mann-Whitney *U*, testi signumun muamele konsantrasyonlarının neden olduğu MN oluşumu bakımından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Genel olarak signumun test edilen konsantrasyonları G₀ fazı lenfositlerinde NPB ve NBUD oluşumuna neden olmuştur. Ancak elde edilen frekanslar değerlendirildiğinde her iki biyomarkır ile konsantrasyon arasında lineer bir ilişkinin olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte signumun artan konsantrasyonları *in vitro* lenfosit kültürde CBPI değerlerinde azalmaya neden olmuş ve bu azalmanın lineer ve aynı zamanda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($R^2=-0,49$, $R=-0,70$, $p<0,05$). Muamele edilen konsantrasyonlar ve çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerleri dikkate alındığında 75 µg/ml signum konsantrasyonunun lenfosit kültürde %58,6 sitotoksisite meydana getirdiği saptanmıştır.



Şekil 21. Signumun her iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)



Şekil 22. 0,25 µg/ml signum ile G_0 fazı lenfositleri muamelesi sonucu oluşan 1 mikronukleuslu binukleat hücre

Çizelge 7. Signumun iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu ‰ MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve ‰ sitotoksisite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	‰ MNL±SH	BNMN	‰ BNMN±SH	Toplam Binukleat	‰ NPB	‰ NBUD	CPBI±SH	‰ Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	269	6	0	0	0	281	***70,3±7,70	275	***68,8±7,57	4000	0,25±0,25	0,00±0,00	-	-
RPMI 1640	14	3	0	0	0	20	5,00±1,23	17	4,30±0,75	4000	0,50±0,29	0,00±0,00	1,63±0,04	-
0,25	37	2	0	1	0	45	11,3±1,70	40	10,0±1,73	4000	0,50±0,50	1,50±0,87	1,50±0,05	21,3
0,5	37	6	1	0	0	52	13,0±1,41	44	11,0±0,41	4000	0,50±0,29	0,50±0,50	*1,46±0,05	26,8
1	38	0	3	0	0	47	11,8±1,49	41	10,3±0,75	4000	2,50±1,67	1,00±0,58	**1,41±0,04	35,5
2	54	2	2	0	0	64	*16,0±1,58	58	**14,5±1,85	4000	1,00±0,41	1,00±0,41	**1,39±0,04	37,7
6	55	3	1	1	0	68	**17,0±1,78	60	**15,0±1,68	4000	3,50±1,85	0,50±0,29	*1,40±0,05	36,4
8	43	1	1	1	0	52	13,0±0,41	46	11,5±0,96	4000	3,25±1,65	1,00±0,71	***1,38±0,03	40,4
25	52	8	0	0	1	73	**18,3±2,84	61	**15,3±1,32	4000	1,00±0,41	1,25±0,75	***1,33±0,03	48,3
75	38	1	0	0	0	40	10,0±2,16	39	9,80±1,93	4000	1,00±0,58	0,50±0,29	***1,26±0,02	58,6

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi

MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi

CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

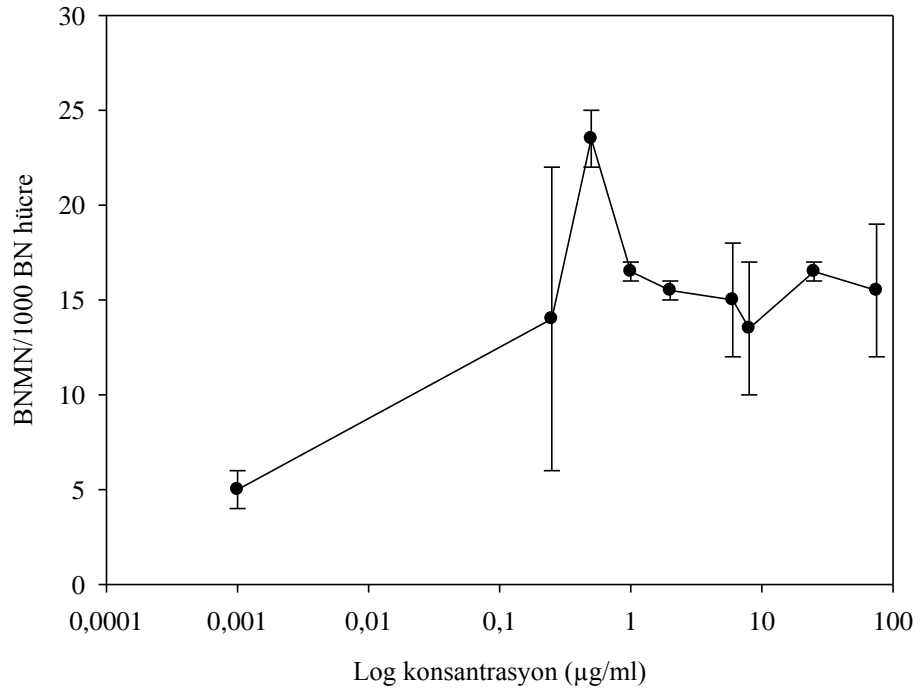
***p<0,001

4.1.2. Boscalidin G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

4.1.2.1. Boscalidin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Boscalidin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisitenin değerlendirilmesi amacıyla kültür ortamına çeşitli konsantrasyonları eklenmiş ancak 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda yeterli sayıda BN hücre elde edilemediği için çalışmaya dahil edilmemişlerdir. Test edilen konsantrasyonları çözücü kontrole göre yüksek sayıda MN oluşturmuştur (Çizelge 8, Şekil 23). Boscalidin değerlendirilen konsantrasyonları BN hücrelerde farklı sayılarda MN oluşturmuştur. Lineer regresyon analizi sonuçları konsantrasyon artışına bağlı olarak MNL ve BNMN frekansında lineer bir artışın olmadığını göstermiştir. Wilcoxon eşleştirilmiş test sonuçları MN oluşumu bakımından yapılan iki deney arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını göstermiştir (p=0,07).

Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında boscalidin NPB oluşumuna neden olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte boscalidin test edilen konsantrasyonları lenfosit kültürde NBUD oluşumuna neden olmuş ancak doza bağlı bir artış tespit edilememiştir. Boscalidin artan konsantrasyonları ile birlikte elde edilen CBPI değerlerinin azaldığı görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler, konsantrasyon ile CBPI arasında saptanan lineer ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($R^2=-0,49$, $p<0,05$). Boscalid ile muamele edilen kültürler ve çözücü kontrolden elde edilen CBPI değerleri dikkate alındığında 75 µg/ml boscalidin periferal kan lenfositlerinde %51,8 oranında sitotoksisite oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 23. Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 8. Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

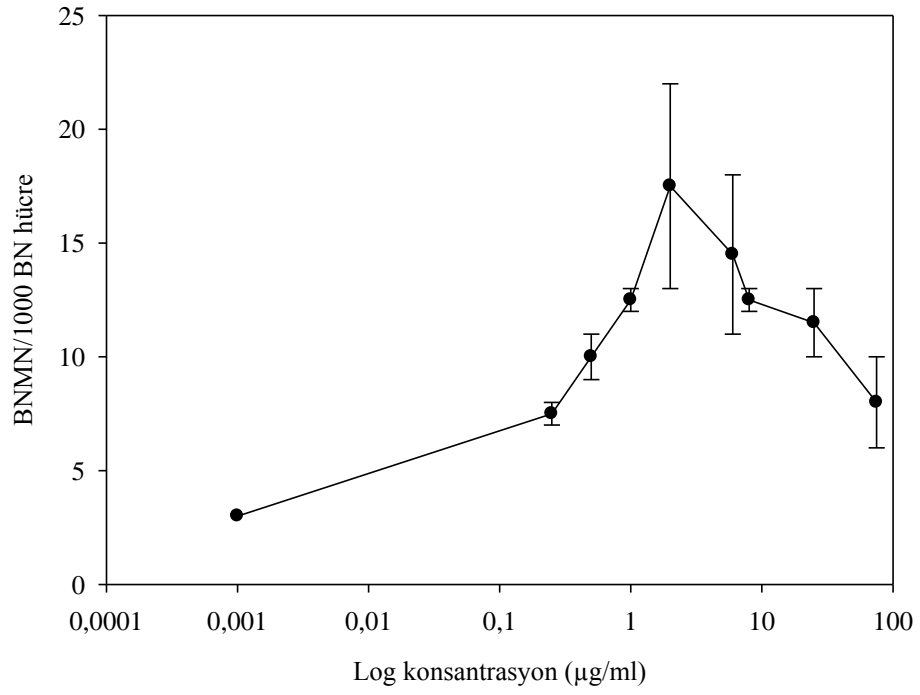
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	161	2	0	0	0	165	82,5±6,50	163	81,5±6,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	-	-
DMSO (< %1 v/v)	10	0	0	0	0	10	5,00±1,00	10	5,00±1,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,66±0,17	-
0,25	22	4	1	1	0	37	18,5±6,50	28	14,0±8,00	2000	0,00±0,00	1,50±1,50	1,59±0,17	11,6
0,5	45	2	0	0	0	49	24,5±2,50	47	23,5±1,50	2000	1,00±1,00	2,00±2,00	1,56±0,17	15,4
1	29	4	0	0	0	37	18,5±0,50	33	16,5±0,50	2000	0,00±0,00	1,00±1,00	1,48±0,01	27,9
2	29	1	1	0	0	34	17,0±1,00	31	15,5±0,50	2000	1,50±1,50	2,00±1,00	1,44±0,17	33,1
6	25	5	0	0	0	35	17,5±5,50	30	15,0±3,00	2000	1,50±1,50	1,50±0,50	1,45±0,16	32,9
8	24	2	1	0	0	31	15,5±4,50	27	13,5±3,50	2000	0,00±0,00	1,00±0,00	1,42±0,14	36,5
25	30	2	1	0	0	37	18,5±0,50	33	16,5±0,50	2000	0,00±0,00	3,50±0,50	1,35±0,07	47,7
75	27	3	1	0	0	36	18,0±5,00	31	15,5±3,50	2000	0,50±0,50	2,50±1,50	1,32±0,09	51,8

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.2.2. Boscalidin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Boscalidin çeşitli konsantrasyonları erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumuna neden olmuşlardır. Çalışmada değerlendirilen bütün konsantrasyonların neden olduğu MNL ve BNMN frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 9). Bununla birlikte boscalidin 100, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının bulunduğu lenfosit kültürlerde yeterli sayıda BN oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde MNL ve BNMN frekanslarının test edilen yüksek konsantrasyonlarda azaldığı görülmüş ancak bu azalma çözücü kontrol kadar olmamıştır (Şekil 24). Lineer regresyon analizi sonuçları, MNL ve BNMN frekanslarının konsantrasyon artışı ile birlikte lineer bir şekilde artmadığını göstermiştir. Wilcoxon eşleştirilmiş test sonuçları yapılan iki deney arasında MN bakımından istatistiksel olarak bir uyum olduğunu göstermiştir (p=0,09).

Boscalid, G₀ fazı lenfositlerinde NPB ve NBUD oluşumuna neden olmuştur. Ancak bazı konsantrasyonlar için elde edilen NPB ve NBUD frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte konsantrasyon artışı ile birlikte NPB ve NBUD frekanslarında lineer bir artış tespit edilmemiştir. Boscalid ile muamele edilen G₀ fazı lenfositlerinde hücre bölünmesini etkilemiştir. Boscalidin test edilen konsantrasyonlarının artması ile birlikte CBPI değerlerinde azalma görülmüştür. Ancak lineer regresyon ile korelasyon analizi sonuçları bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir. Muamele edilen kültürler ile çözücü kontrolden elde edilen CBPI değerleri göz önüne alındığında 75 µg/ml signumun lenfosit kültürde %52,6 oranında sitotoksisite oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 24. Boscalidin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 9. Boscalidin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

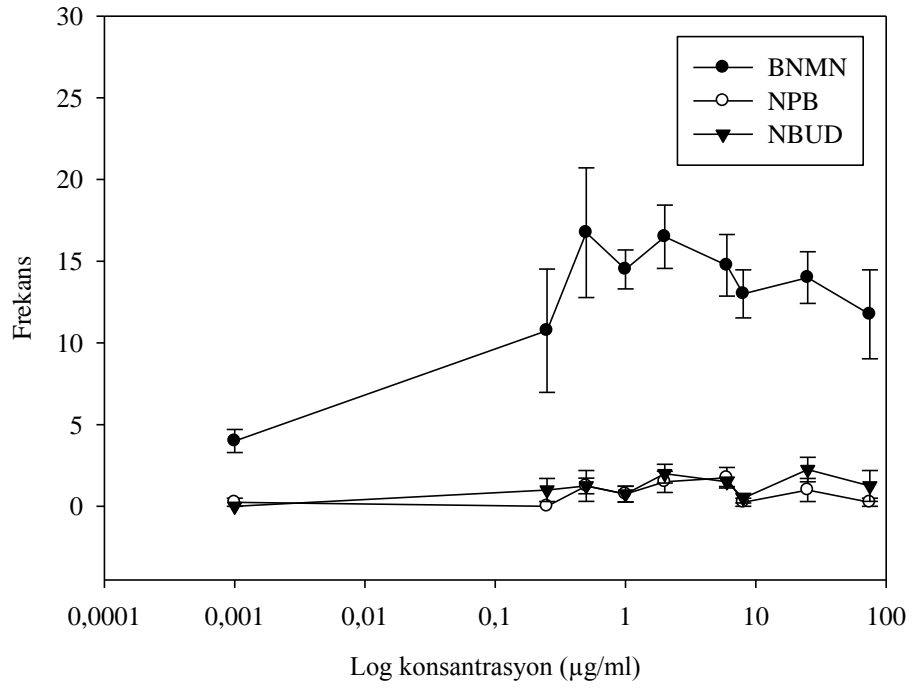
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	76	3	0	0	0	82	41,5±0,00	79	39,5±0,50	2000	1,50±0,50	1,00±1,00	-	-
DMSO (< %1 v/v)	6	0	0	0	0	6	3,00±0,00	6	3,00±0,00	2000	0,50±0,50	0,00±0,00	1,51±0,01	-
0,25	13	2	0	0	0	17	8,50±0,50	15	7,50±0,50	2000	0,00±0,00	0,50±0,50	1,38±0,02	25,5
0,5	19	1	0	0	0	21	10,5±1,50	20	10,0±1,00	2000	1,50±0,50	0,50±0,50	1,39±0,01	22,2
1	24	1	0	0	0	26	13,0±1,00	25	12,5±0,50	2000	1,50±0,50	0,50±0,50	1,34±0,00	33,7
2	31	4	0	0	0	39	19,5±5,50	35	17,5±4,50	2000	1,50±0,50	2,00±1,00	1,32±0,00	37,5
6	27	1	0	1	0	33	16,5±5,50	29	14,5±3,50	2000	2,00±0,00	1,50±0,50	1,31±0,00	38,8
8	24	0	0	0	1	29	14,5±1,50	25	12,5±0,50	2000	0,50±0,50	0,00±0,00	1,28±0,01	44,2
25	23	0	0	0	0	23	11,5±1,50	23	11,5±1,50	2000	2,00±1,00	1,00±0,00	1,28±0,02	44,4
75	16	0	0	0	0	16	8,00±2,00	16	8,00±2,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,24±0,01	52,6

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.2.3. Boscalidin İki Donörden Alınan Periferik Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksosite

Boscalidin herbir konsantrasyonu için 4000 BN hücrenin değerlendirilmiş ve değerlendirilen parametrelere ilişkin veriler çizelgede verilmiştir (Çizelge 10). Çalışmada 100, 150 ve 200 µg/ml boscalid ile muamele edilen lenfosit kültürde yeterli sayıda BN hücresi oluşmadığı için değerlendirilmemiştir. Uygulanan bütün konsantrasyonlar çözücü kontrolden daha fazla MN oluşumuna neden olmuşlardır (Şekil 25). Ayrıca lenfosit kültürde birçok BN hücrede birde fazla MN oluşumu da görülmüştür. Lineer regresyon analizi sonuçları boscalidin neden olduğu MNL ve BNMN frekansları ile test edilen konsantrasyonlar arasında lineer bir ilişki olmadığını göstermiştir. Signumdan farklı olarak BNMN frekansları bakımından cinsiyetler arasında fark bulunmuştur (Mann-Whitney *U* test, $p<0,05$).

Genel olarak, boscalidin bazı konsantrasyonlarının çözücü konrole göre daha fazla NPB ve NBUD oluşumuna yol açtığı görülmüştür. Ancak lineer regresyon analizi sonuçları her iki parametre ile konsantrasyon artışı arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Total olarak, artan boscalid konsantrasyonları ile birlikte CBPI değerinden azalma gözlemlenmiştir. CBPI ile test edilen konsantrasyonlar arasında elde edilen negatif korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sapanmıştır ($R^2=-0,44$, $R=-0,66$, $p=0,52$). Lenfositler ile muamele edilen her bir konsantrasyon ile çözücü kontrole ait CBPI değerleri dikkate alındığında 75 µg/ml boscalid konsantrasyonunun lenfosit kültürde %52,1 oranında sitotoksosite oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 25. Boscalidin her iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 10. Boscalidin iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	%	BNMN	%	Toplam Binukleat	% NPB	%	CPBI	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 $\mu\text{g/ml}$)	237	5	0	0	0	247	***61,8 \pm 12,09	242	***60,5 \pm 12,41	4000	0,75 \pm 0,48	0,50 \pm 0,50	-	-
DMSO (< %1 v/v)	16	0	0	0	0	16	4,00 \pm 0,71	16	4,00 \pm 0,71	4000	0,25 \pm 0,25	0,00 \pm 0,00	1,59 \pm 0,08	-
0,25	35	6	1	1	0	54	13,5 \pm 3,93	43	10,8 \pm 3,77	4000	0,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,71	1,48 \pm 0,09	17,3
0,5	64	3	0	0	0	70	17,5 \pm 4,21	67	*16,8 \pm 3,97	4000	1,25 \pm 0,49	1,25 \pm 0,95	1,48 \pm 0,08	18,0
1	53	5	0	0	0	63	15,8 \pm 1,65	58	14,5 \pm 1,19	4000	0,75 \pm 0,48	0,75 \pm 0,48	1,41 \pm 0,06	30,7
2	60	5	1	0	0	73	*18,3 \pm 2,39	66	*16,5 \pm 1,94	4000	1,50 \pm 0,66	2,00 \pm 0,58	1,38 \pm 0,08	34,8
6	52	6	0	1	0	68	17,0 \pm 3,19	59	14,8 \pm 1,89	4000	1,75 \pm 0,63	1,50 \pm 0,29	1,38 \pm 0,07	35,7
8	48	2	1	0	1	60	15,0 \pm 1,96	52	13,0 \pm 1,47	4000	0,25 \pm 0,25	0,50 \pm 0,29	1,35 \pm 0,07	39,6
25	53	2	1	0	0	60	15,0 \pm 2,12	56	14,0 \pm 1,58	4000	1,00 \pm 0,71	2,25 \pm 0,75	1,31 \pm 0,03	46,4
75	43	3	1	0	0	52	13,0 \pm 3,63	47	11,8 \pm 2,72	4000	0,25 \pm 0,25	1,25 \pm 0,95	*1,28 \pm 0,04	52,2

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi

MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi

CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

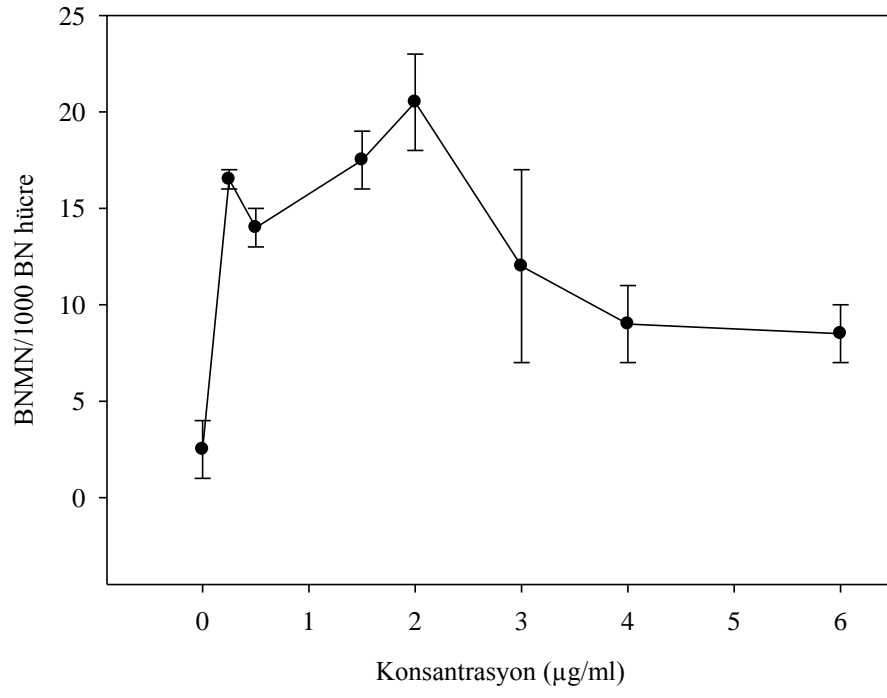
***p<0,001

4.1.3. Pyraclostrobinin G₀ Fazında Bulunan İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

4.1.3.1. Pyraclostrobinin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Bayan donörden alınan periferal kan örneklerinde pyraclostrobinin oluşturduğu genotoksisite ve sitotoksisiteye ilişkin veriler çizelge 11'de verilmiştir. Çalışmada pyraclostrobinin 8 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarının bulunduğu kültürlerde yeterli sayıda BN hücre elde edilemediği için değerlendirilmemişlerdir. Test edilen bütün konsantrasyonların neden oldukları MNL ve BNMN frekansları çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur (Şekil 26). Bir MN'li BN'ların yanında iki MN'li BN hücrelerin de olduğu görülmüştür. Lineer regresyon analizi sonuçları MNL ve BNMN frekanslarındaki artışın konsantrasyona bağlı olarak lineer bir şekilde artmadığını göstermiştir. Wilcoxon eşleştirilmiş testi, MN oluşumu dikkate alındığında yapılan iki deney arasında bir fark olmadığını göstermiştir (p=0,09).

Pyraclostrobinin test edilen konsantrasyonları periferal kan lenfositlerinde NPB oluşumuna neden olmuşlardır. Elde edilen NPB frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak lineer regresyona analizi sonuçları konsantrasyon ile NPB frekansı lineer bir artışın olmadığını göstermiştir. Pyraclostrobin lenfosit kültürde çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı NBUD oluşumuna neden olmamıştır. Diğer taraftan pyraclostrobin kültür ortamında lenfositlerin hücre bölünme özelliklerin etkilemiş ve artan konsantrasyonlar ile birlikte CBPI değerlerinde azalma görülmüştür. Tespit edilen bu azalmanın konsantrasyon artışı ile birlikte lineer bir şekilde azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($R^2=-0,51$, $p<0,05$). Muamele edilen konsantrasyonlar ile çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerleri değerlendirildiğinde pyraclostrobinin 6 µg/ml konsantrasyonu lenfosit kültürde %50-60 sitotoksisite oluşturmuştur.



Şekil 26. Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH)

Çizelge 11. Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

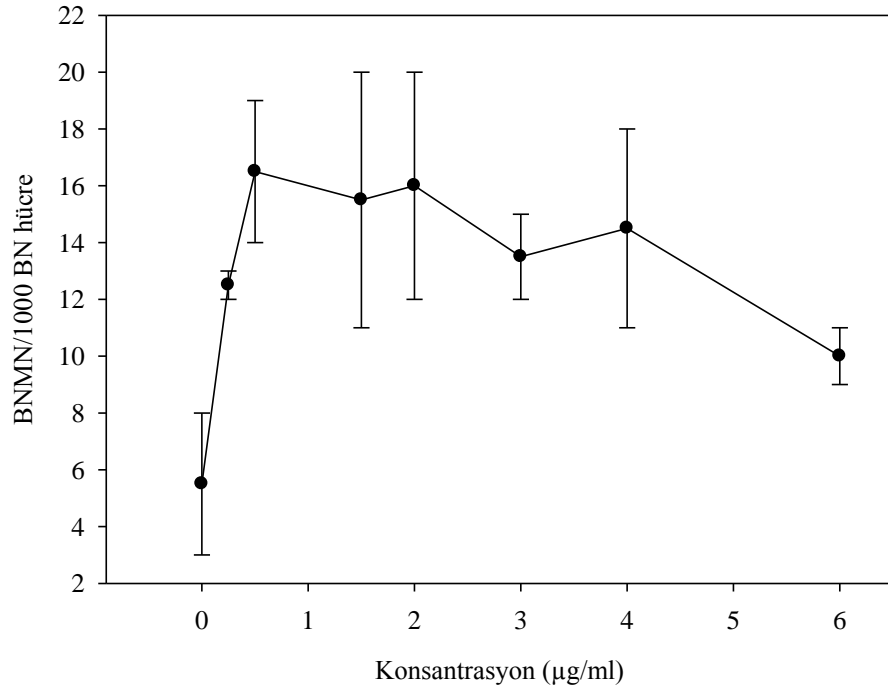
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	139	4	0	0	0	147	73,5±4,50	143	71,5±3,50	2000	1,00±1,00	0,00±0,00	-	-
DMSO (< %1 v/v)	5	0	0	0	0	5	2,50±1,50	5	2,50±1,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,67±0,03	-
0,25	30	3	0	0	0	36	18,0±0,00	33	16,5±0,50	2000	3,00±1,00	0,50±0,50	1,48±0,02	28,6
0,5	25	3	0	0	0	31	15,5±0,50	28	14,0±1,00	2000	1,50±0,50	1,00±1,00	1,46±0,04	30,6
1,5	33	2	0	0	0	37	18,5±2,50	35	17,5±1,50	2000	3,00±1,00	1,00±0,00	1,37±0,03	44,7
2	39	2	0	0	0	43	21,5±1,50	41	20,5±2,50	2000	4,50±1,50	1,50±0,50	1,36±0,02	45,8
3	21	3	0	0	0	27	13,5±5,50	24	12,0±5,00	2000	3,00±2,00	0,00±0,00	1,34±0,01	48,7
4	16	2	0	0	0	20	10,0±2,00	18	9,00±2,00	2000	2,50±1,50	1,00±0,00	1,39±0,03	41,5
6	17	0	0	0	0	17	8,50±1,50	17	8,50±1,50	2000	1,50±0,50	0,50±0,50	1,32±0,02	52,4

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.3.2. Pyraclostrobinin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Pyraclostrobin, erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumuna neden olmuştur (Çizelge 12). Test edilen her bir konsantrasyon için elde edilen MN ve BNMN frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 27). Bununla birlikte pyraclostrobinin eklendiği kültürlerde bir MN'li BN'li hücrelerin yanında birden fazla MN içeren BN hücrelerinin de olduğu görülmüştür. Lineer regresyon analizi sonuçları konsantrasyon artışı ile MN ve BNMN frekansları arasında doğrusal bir ilişki olmadığını göstermiştir. Paralel olarak hazırlanan iki deneye ait MNL ve BNMN sonuçları incelendiğinde genellikle frekansların sabit kaldığı veya yüksek konsantrasyonlarda azaldığı görülmüştür. Ancak bu azalma çözücü kontrol seviyesine veya bu seviyenin altına inmemiştir.

Pyraclostrobin ile muamele edilen G₀ fazı lenfositlerinde NPB ve NBUD oluşumu gözlemlenmiştir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda daha fazla NPB oluştuğu görülmüş ancak konsantrasyon artışı ile birlikte bir artış görülmemiştir. Pyraclostrobin erkek bireyden alınan periferal kan lenfositlerinde hücre siklusu bölünme özelliğini etkilemiştir. Konsantrasyon artışı ile birlikte CBPI değerlerinde azalma görülmüştür. Bu azalma lineer bir şekilde olup istatistiksel açıdan anlamlıdır ($R^2=-0,71$, $p<0,01$). G₀ fazı lenfositleri ile muamele edilen her bir konsantrasyon ile çözücü kontrole ait CBPI değerleri dikkate alındığında 6 µg/ml pyraclostrobinin %58,2 sitotoksisite oluşturduğu tespit edilmiştir.



Şekil 27. Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 12. Pyraclostrobin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

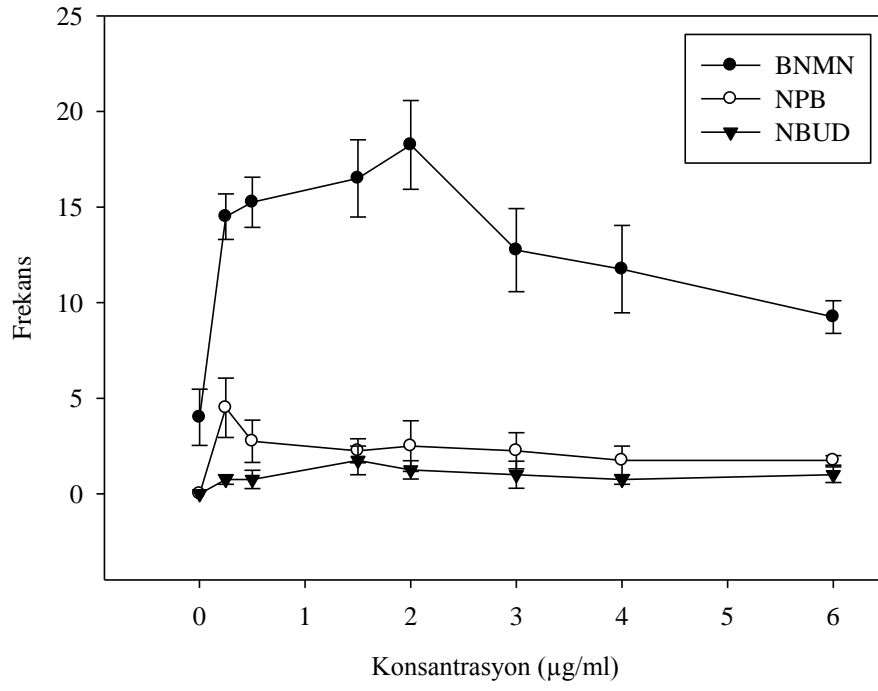
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	133	4	0	0	0	141	70,5±1,50	137	68,5±3,50	2000	0,00±0,00	1,50±1,50	-	-
DMSO (< % 1 v/v)	11	0	0	0	0	11	5,50±2,50	11	5,50±2,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,62±0,04	-
0,25	22	2	1	0	0	29	14,5±2,50	25	12,5±0,50	2000	6,00±3,00	1,00±0,00	1,46±0,05	25,1
0,5	29	4	0	0	0	37	18,5±3,50	33	16,5±2,50	2000	4,00±2,00	0,50±0,50	1,42±0,01	32,8
1,5	28	3	0	0	0	34	17,0±5,00	31	15,5±4,50	2000	1,50±0,50	2,50±1,50	1,37±0,02	39,6
2	29	3	0	0	0	35	17,5±3,50	32	16,0±4,00	2000	0,50±0,50	1,00±1,00	1,36±0,00	42,1
3	25	2	0	0	0	29	14,5±2,50	27	13,5±1,50	2000	1,50±0,50	2,00±1,00	1,33±0,01	46,9
4	23	6	0	0	0	35	17,5±3,50	29	14,5±3,50	2000	1,00±0,00	0,50±0,50	1,29±0,01	53,9
6	15	3	1	1	0	28	14,0±4,00	20	10,0±1,00	2000	2,00±0,00	1,50±0,50	1,26±0,01	58,2

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.3.3. Pyraclostrobinin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Çalışmada değerlendirilen 4000 BN hücrede oluşan MN dağılımları ile diğer parametrelere ait veriler çizelge 13'te verilmiştir. Pyraclostrobinin test edilen bütün konsantrasyonları, çözücü kontrolden daha yüksek MN oluşumuna neden olmuştur (Şekil 28). Ancak değerlendirilen yüksek konsantrasyonlarda MN frekansında azalma görülmüştür. Bu azalma hiçbir zaman çözücü kontrol için elde edilen değerler kadar olmamıştır. Lineer regresyon analizi konsantrasyon artışına bağlı olarak MNL ve BNMN frekansında lineer bir artış olmadığını göstermiştir. Bayan ve erkek donör için elde edilen MNL ve BNMN frekansları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür (Mann-Whitney U , $p=0,63$).

Her iki donörden alınan sonuçlar dikkate alındığında pyraclostrobinin G_0 fazı lenfositlerinde NPB ve NBUD oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Test edilen konsantrasyonlar için NPB ve NBUD frekansları çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur. Ancak konsantrasyon artışı ile birlikte bir artış tespit edilmemiştir. Diğer taraftan pyraclostrobinin hücre bölünme kinetiğini etkilediği görülmüştür. Test edilen her bir konsantrasyon ve çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerleri dikkate alındığında aralarında negatif lineer bir ilişkinin olduğu görülmüştür ($R^2=-0,63$, $p<0,05$). Muamele konsantrasyonlar ile çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerleri dikkate alındığında 6 $\mu\text{g/ml}$ pyraclostrobinin G_0 fazı lenfositlerinde %55,1 oranında sitotoksisiteye neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 28. Pyraclostrobinin her iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 13. Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	272	8	0	0	0	288	***72,0±2,12	280	***70,0±1,47	4000	0,50±0,50	0,75±0,75	-	-
DMSO (< %1 v/v)	16	0	0	0	0	16	4,00±1,47	16	4,00±1,19	4000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,64±0,03	-
0,25	52	5	1	0	0	65	16,3±1,44	58	14,5±1,32	4000	*4,50±1,56	0,75±0,25	***1,47±0,02	27,1
0,5	54	7	0	0	0	68	17,0±1,68	61	*15,3±1,65	4000	2,75±1,11	0,75±0,48	***1,44±0,02	31,8
1,5	61	5	0	0	0	71	*17,8±2,32	66	*16,5±2,32	4000	2,25±0,63	1,75±0,75	***1,37±0,01	42,3
2	68	5	0	0	0	78	**19,5±1,96	73	**18,3±2,18	4000	2,50±1,32	1,25±0,48	***1,36±0,01	44,1
3	46	5	0	0	0	56	14,0±2,48	51	12,8±2,29	4000	2,25±0,96	1,00±0,71	***1,34±0,01	47,9
4	39	8	0	0	0	55	13,8±2,72	47	11,8±0,85	4000	1,75±0,75	0,75±0,25	***1,34±0,03	47,2
6	32	3	1	1	0	45	11,3±2,36	37	9,25±2,20	4000	1,75±0,25	1,00±0,41	***1,29±0,02	55,1

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi

MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi

CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

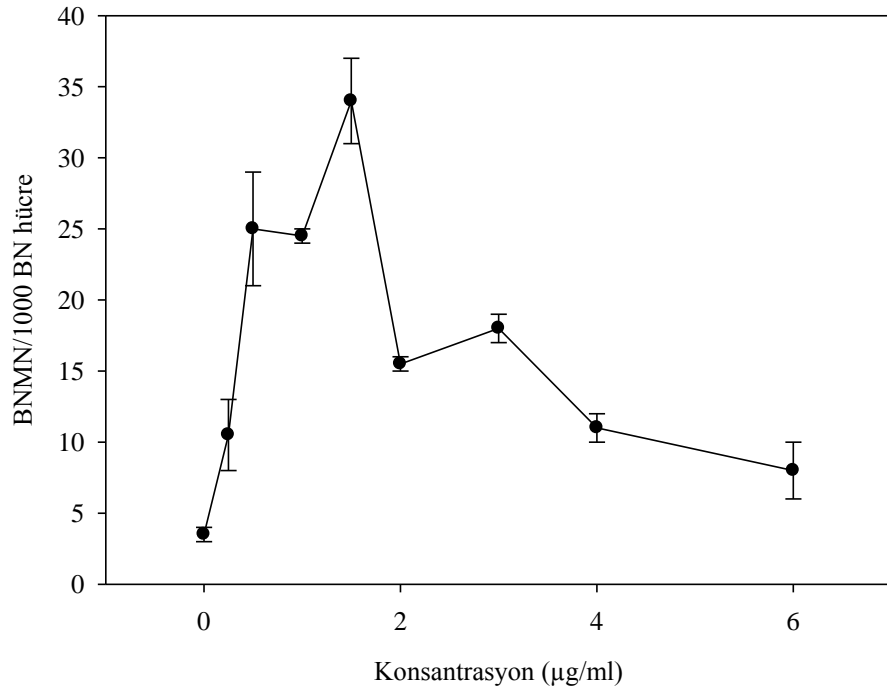
***p<0,001

4.1.4. Signumun Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

4.1.4.1. Signumun Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinin signumun farklı konsantrasyonları ile 28 saat muamele edilmesi MN oluşumuna neden olmuştur (Çizelge 14). Test edilen signum konsantrasyonları çözücü kontrole göre daha fazla MNL ve BNMN oluşturmuşlardır (Şekil 29). Bununla birlikte signum siklusta ilerleyen lenfositlerde birden fazla MN oluşumuna da neden olmuştur. Çalışmada en yüksek konsantrasyon olarak değerlendirilen 8 µg/ml’de yeterli sayıda BN hücre oluşmamıştır. Lineer regresyon analizi sonuçları, konsantrasyon artışına bağlı olarak MNL ve BNMN frekanslarında lineer bir artış olmadığını göstermiştir. Her iki deneyde signumun yüksek konsantrasyonlarında MNL ve BNMN frekanslarında azalma görülmüş ancak bu azalma çözücü kontrol kadar olmamıştır. Wilcoxon eşleştirilmiş testi MN oluşumu dikkate alındığında yapılan iki paralel deney arasında bir fark olmadığını göstermiştir (p=0,77).

Signum ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde NPB oluşumu saptanmıştır. Signumun test edilen konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre daha fazla NBP oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Bununla birlikte signum NBUD oluşumuna da neden olmuştur. Test edilen her bir konsantrasyon için elde edilen NBUD frekansları çözücü kontrole göre daha yüksektir. Elde edilen NPB ve NBUD frekanslarının konsantrasyon artışı ile birlikte lineer bir şekilde artmadığı tespit edilmiştir. Test edilen signum konsantrasyonları ile birlikte lenfosit bölünmesinde azalma meydana gelmiştir. Buna bağlı olarak meydana gelen CBPI değerlerindeki azalmanın lineer ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($R^2=-0,72$, $p<0,01$). Muamele edilen kültürler ve çözücü kontrole ait CBPI değerleri dikkate alındığında 6 µg/ml signumun siklusta ilerleyen lenfositlerde %55,1 oranında sitotoksisite meydana getirdiği saptanmıştır.



Şekil 29. Signumun bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 14. Signumun bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

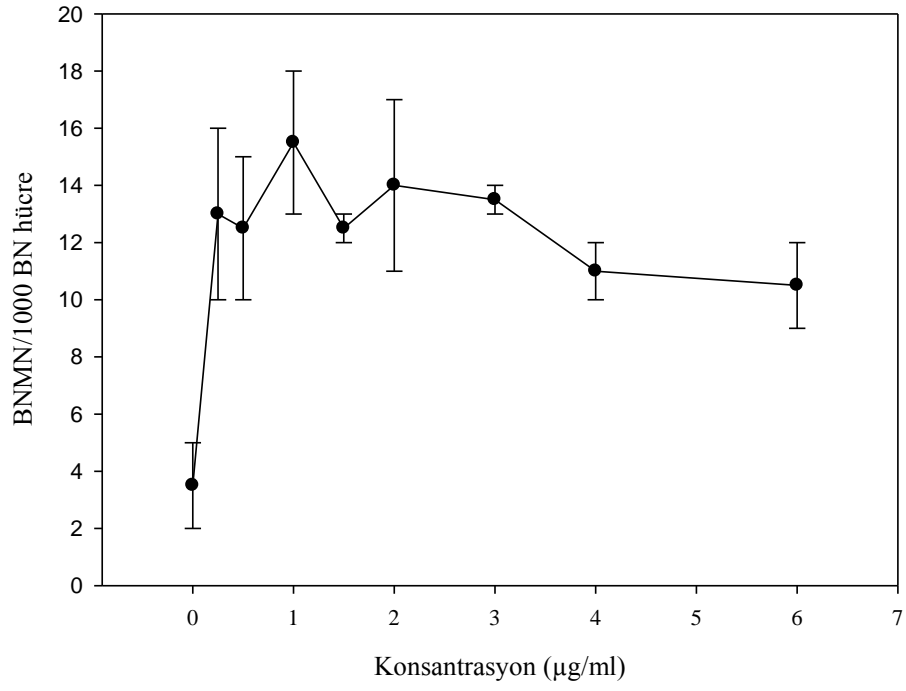
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	247	13	0	1	0	277	139±6,50	261	131±5,50	2000	0,00±0,00	1,00±1,00	-	-
RPMI 1640	7	0	0	0	0	7	3,50±0,50	7	3,50±0,50	2000	0,50±0,50	0,50±0,50	1,50±0,04	-
0,25	18	2	1	0	0	25	12,5±4,50	21	10,5±2,50	2000	9,00±1,00	2,00±1,00	1,39±0,03	22,4
0,5	43	7	0	0	0	57	28,5±4,50	50	25,0±4,00	2000	14,5±0,50	5,00±1,00	1,36±0,02	27,7
1	43	4	1	0	1	59	29,5±1,00	49	24,5±0,50	2000	19,0±2,00	2,00±0,00	1,35±0,01	30,2
1,5	61	6	1	0	0	76	38,0±2,50	68	34,0±3,00	2000	17,5±2,50	3,50±2,50	1,32±0,04	37,1
2	28	2	1	0	0	35	17,5±0,50	31	15,5±0,50	2000	19,0±5,00	1,50±0,50	1,30±0,02	41,1
3	29	6	1	0	0	44	22,0±3,00	36	18,0±1,00	2000	19,5±1,50	1,00±1,00	1,29±0,01	42,7
4	21	0	1	0	0	24	12,0±0,00	22	11,0±1,00	2000	16,5±1,50	1,50±0,50	1,27±0,02	46,5
6	13	2	0	1	0	21	10,5±0,50	16	8,00±2,00	2000	14,0±1,00	0,50±0,50	1,23±0,00	55,1

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.4.2. Signumun Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Erkek donörden alınan periferal kan lenfositleri 28 saat süre ile signumun çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve çalışmada değerlendirilen parametrelere ilişkin veriler çizelge 15'de verilmiştir. Buna göre, signumun herbir konsantrasyonu için elde edilen MNL ve BNMN frekansları çözücü kontrole için elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur (Şekil 30). Signum ile muamele edilen lenfositlerde bir MN'li BN hücrelerinin yanında birden fazla MN içeren BN hücrelerinin de olduğu görülmüştür. Artan signum konsantrasyonları ile MNL ve BNMN frekansları arasında lineer bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Wilcoxon eşleştirilmiş testi her iki deneyden elde edilen sonuçların kendi aralarında uyumlu olduklarını göstermiştir ($p=0,40$).

Signum, siklusta ilerleyen lenfositlerde NPB oluşumuna neden olmuştur. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında test edilen konsantrasyonların daha fazla NPB frekansına sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca signum, NBUD oluşumuna neden olmuştur. Elde edilen frekansların çözücü kontrole göre yüksek olduğu ancak NPB ve NBUD frekansları dikkate alındığında konsantrasyon artışı ile aralarında lineer bir ilişki olmadığı görülmüştür. Artan signum konsantrasyonu hücre bölünme özelliğini etkilemiş ve bölünme yetenekleri azalmıştır. Signumun artan konsantrasyonları ile birlikte lenfositlerin bölünme yeteneklerinin göstergesi olan CBPI değerlerinde azalma görülmüştür. Lineer regresyon analizi konsantrasyon artışı ile birlikte CBPI arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermiştir ($R^2=-0,85$, $p<0,0001$). Muamele gruplar ile çözücü kontrol CBPI değerleri göz önüne alındığında en yüksek signum konsantrasyonunun %52,2 oranında sitotoksisite oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 30. Signumun erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 15. Signumun erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

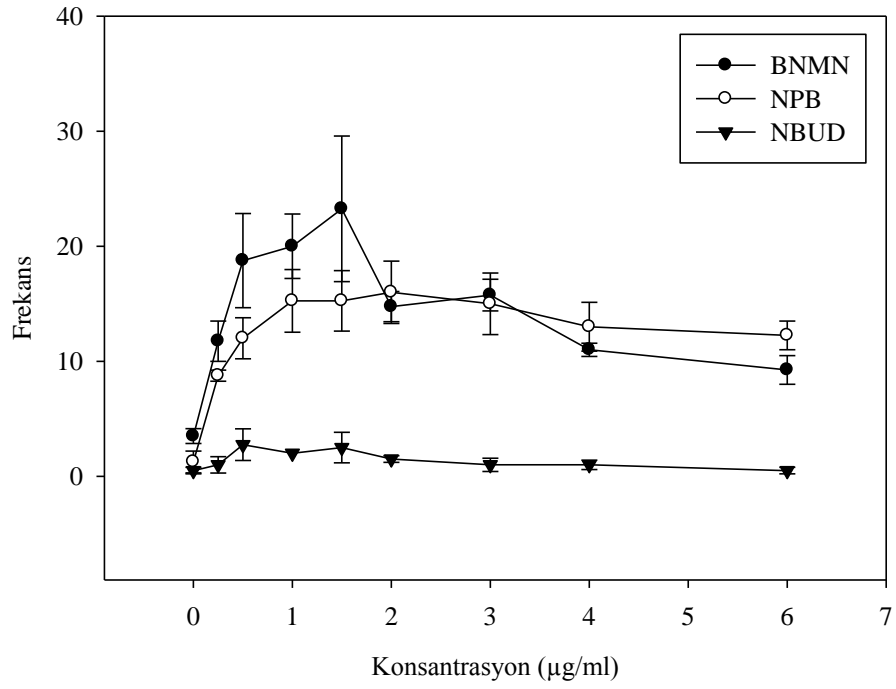
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	117	6	0	0	0	129	64,5±6,50	123	61,5±6,50	2000	0,50±0,50	1,00±1,00	-	-
RPMI 1640	5	2	0	0	0	9	4,50±2,50	7	3,50±1,50	2000	2,00±2,00	0,50±0,50	1,45±0,02	-
0,25	24	1	1	0	0	29	14,5±3,50	26	13,0±3,00	2000	8,50±0,50	0,00±0,00	1,38±0,01	14,3
0,5	20	3	1	1	0	33	16,5±0,50	25	12,5±2,50	2000	9,50±2,50	0,50±0,50	1,34±0,02	23,3
1	29	2	0	0	0	33	16,5±2,50	31	15,5±2,50	2000	11,5±3,50	2,00±0,00	1,33±0,00	26,7
1,5	23	2	0	0	0	27	13,5±1,50	25	12,5±0,50	2000	13,0±5,00	1,50±1,50	1,34±0,03	23,2
2	26	1	1	0	0	31	15,5±1,50	28	14,0±3,00	2000	13,0±1,00	1,50±0,50	1,31±0,01	30,9
3	26	1	0	0	0	28	14,0±0,00	27	13,5±0,50	2000	10,5±0,50	1,00±1,00	1,28±0,01	37,5
4	22	0	0	0	0	22	11,0±1,00	22	11,0±1,00	2000	9,50±0,50	0,50±0,50	1,25±0,03	44,6
6	19	0	2	0	0	25	12,5±3,50	21	10,5±1,50	2000	10,5±0,50	0,50±0,50	1,21±0,01	52,2

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

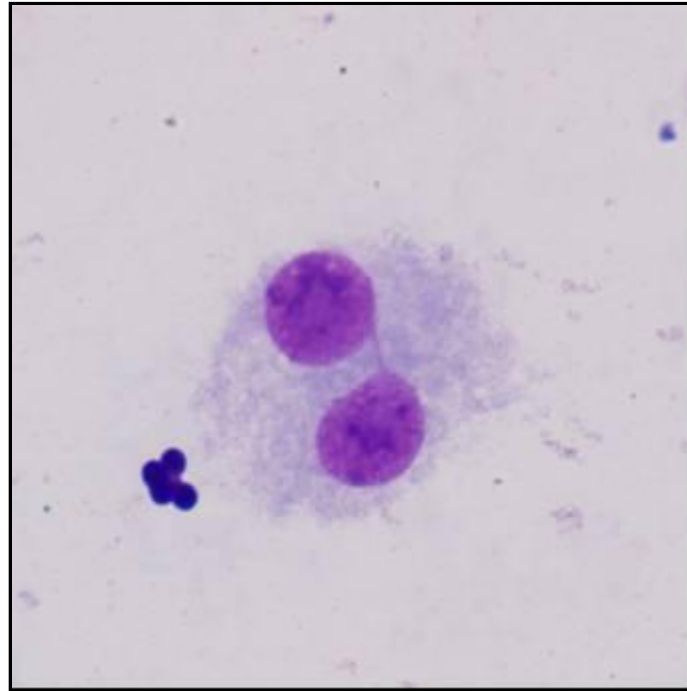
4.1.4.3. Signumun İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Toplam olarak 4000 BN hücrenin değerlendirilmesi sonucu belirlenen genotoksisite ile diğer parametrelere ilişkin veriler çizelge 16'da verilmiştir. Signum ile muamele edilen lenfositlerde bir ve birden fazla MN'li BN hücrelerinin olduğu görülmüştür. Çalışmada en yüksek konsantrasyon olarak değerlendirilen 8 µg/ml'de yeterli sayıda BN hücre oluşmadığı için değerlendirmeye alınmamıştır. Test edilen her bir signum konsantrasyonu çözücü kontrole göre daha yüksek MN oluşumuna neden olmuştur (Şekil 31). Signumun yüksek konsantrasyonlarında oluşan MN frekansında azalma görülmüş ancak bu azalma çözücü kontrol kadar olmamıştır. Cinsiyet göz önüne alındığında MN oluşumu bakımında bir fark olmadığı görülmüştür (Mann-Whitney *U*, $p=0,069$). Elde edilen sonuçlara lineer regresyon analizi uygulanmış ve konsantrasyona bağlı MNL ve BNMN artışı görülmemiştir.

Signum siklusta ilerleyen lenfositlerde NPB oluşumuna neden olmuştur. Test edilen her bir konsantrasyonun neden olduğu NPB frekansının çözücü kontrole göre yüksek olduğu ve signumun NBUD oluşuma neden olduğu görülmüştür. Meydana gelen NBUD frekanslarının çözücü kontrolde meydana gelen NBUD frekansı kadar veya daha fazla olduğu görülmüştür. Signumun artan konsantrasyonları CBPI değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Konsantrasyon artışı ile CBPI değerlerinde meydana gelen azalmanın lineer ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($R^2=-0,78$, $p<0,01$). Test edilen konsantrasyonlar ile çözücü kontrolden elde edilen CBPI değerleri göz önüne alındığında signumun siklusta ilerleyen periferal kan lenfositlerinde %53,7 oranında sitotoksisiteye neden olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 31. Signumun iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)



Şekil 32. 1 µg/ml signum ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan NPB'lü binukleat hücre

Çizelge 16. Signumun iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	%	MNL±SH	BNMN	%	BNMN±SH	Toplam Binokleat	%	NPB±SH	NBUD±SH	%	CBPI±SH	%	Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4														
MMC (0,05 µg/ml)	364	19	0	1	0	406	***102±21,12	384	***96,0±20,22	4000	0,25±0,25	1,00±0,58	-	-					
RPMI 1640	12	2	0	0	0	16	4,00±1,08	14	3,50±0,65	4000	1,25±0,95	0,50±0,29	1,48±0,23	-					
0,25	42	3	2	0	0	54	13,5±2,40	47	11,8±1,75	4000	8,75±0,48	1,00±0,71	***1,39±0,01	18,6					
0,5	63	10	1	1	0	90	**22,5±3,93	75	*18,8±4,09	4000	12,00±1,78	2,75±1,38	***1,35±0,01	25,6					
1	72	6	1	0	1	92	**23,0±3,22	80	**20,0±2,80	4000	*15,25±2,72	2,00±0,00	***1,34±0,01	28,5					
1,5	84	8	1	0	0	103	*25,8±6,75	93	**23,3±6,33	4000	*15,25±2,63	2,50±1,32	***1,33±0,02	30,5					
2	54	3	2	0	0	66	16,5±1,08	59	14,8±1,32	4000	*16,00±2,71	1,50±0,29	***1,30±0,01	36,2					
3	55	7	1	0	0	72	*18,0±2,61	63	*15,8±1,38	4000	*15,00±2,68	1,00±0,58	***1,28±0,01	40,2					
4	43	0	1	0	0	46	11,5±0,50	44	11,0±0,58	4000	13,00±2,12	1,00±0,41	***1,26±0,02	45,5					
6	32	2	2	1	0	46	11,5±1,55	37	9,30±1,25	4000	12,25±1,25	0,50±0,29	***1,22±0,01	53,7					

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binokleat hücre sayısı, NPB: Nükleoplazmik köprü, NBUD: Nüklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi

MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi

CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

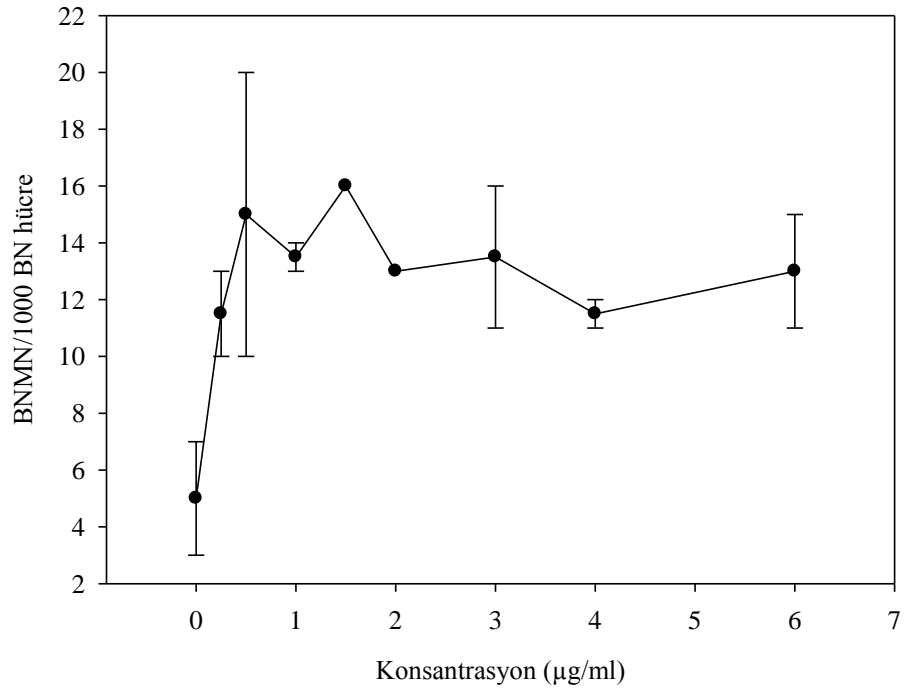
***p<0,001

4.1.5. Boscalidin Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

4.1.5.1. Boscalidin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Boscalidin farklı konsantrasyonlarının 28 saat süre ile bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisite ve sitotoksisiteye ilişkin veriler çizelge 17'de verilmiştir. Paralel olarak gerçekleştirilen iki deneyde boscalidin farklı konsantrasyonlarının MN oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33). Elde edilen MNL ve BNMN frekanslarının çözücü kontrolde oluşan değerlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Her iki deneyde boscalidin BN hücrelerde birden fazla MN oluşumuna da neden olduğu tespit edilmiştir. Boscalidin artan konsantrasyonları ile birlikte MNL ve BNMN frekanslarında bir artış tespit edilmemiştir. Boscalidin 0,5 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlarında MNL ve BNMN frekanslarının artmadığı ve sabit bir şekilde kaldığı görülmüştür. Lineer regresyon analizi, konsantrasyon artışı ile MNL ve BNMN frekansları arasında bir ilişkinin olmadığını göstermiştir. Wilcoxon eşleştirilmiş testi yapılan iki deney arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını göstermiştir (p=0,18).

Boscalid siklusta ilerleyen lenfositlerde NPB ve NBUD oluşumuna neden olmuştur. Her bir konsantrasyon için elde edilen NPB frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu ancak meydana gelen bu artışların konsantrasyona bağlı olmadığı görülmüştür. Diğer taraftan boscalid hücre siklusu üzerine olumsuz etki göstermiş ve test edilen konsantrasyonlarda CBPI değerlerinde azalma görülmüştür. Lineer regresyon analizi, konsantrasyon artışı ile azalan CBPI değerleri arasında lineer ve anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir ($R^2=-0,71$, $p<0,01$). Muamele edilen konsantrasyonlar ile çözücü kontrole ait CBPI değerleri göz önüne alındığında 6 µg/ml boscalidin siklusta ilerleyen lenfositlerde %49,3 oranında sitotoksik etki yarattığı görülmüştür.



Şekil 33. Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 17. Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

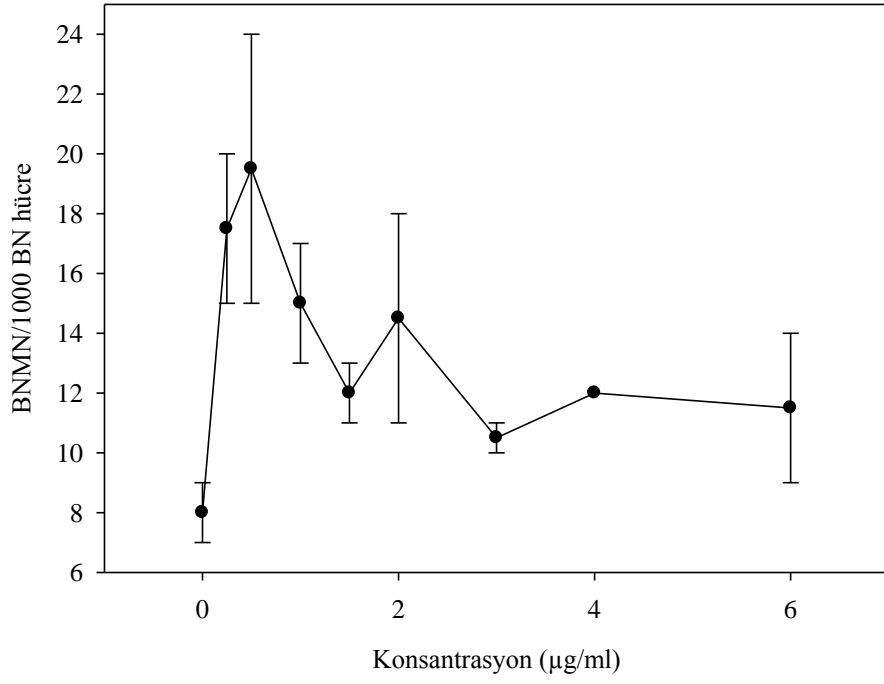
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	214	2	0	0	0	218	109±7,00	216	108±8,00	2000	0,00±0,00	0,50±0,50	-	-
DMSO (< %1 v/v)	8	2	0	0	0	12	6,00±2,00	10	5,00±2,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,43±0,03	-
0,25	22	0	0	0	1	27	13,5±3,50	22	11,5±1,00	2000	0,00±0,00	1,50±0,50	1,34±0,05	21,1
0,5	28	2	0	0	0	32	16,0±4,50	30	15,0±5,00	2000	1,00±1,00	1,00±1,00	1,31±0,04	27,3
1	26	1	0	0	0	28	14,0±1,00	26	13,5±0,00	2000	0,50±0,50	1,00±0,00	1,30±0,04	28,9
1,5	29	2	1	0	0	36	18,0±2,00	32	16,0±0,00	2000	3,50±2,50	0,50±0,50	1,31±0,03	27,2
2	23	3	0	0	0	29	14,5±1,50	26	13,0±0,00	2000	1,00±1,00	0,00±0,00	1,30±0,03	29,2
3	27	0	0	0	0	27	13,5±2,50	27	13,5±2,50	2000	3,00±1,00	0,50±0,50	1,27±0,03	35,7
4	22	1	0	0	0	24	12,0±1,50	23	11,5±0,50	2000	3,00±1,00	0,50±0,50	1,26±0,03	39,8
6	18	6	1	1	0	37	18,5±4,50	26	13,0±2,00	2000	4,50±1,50	2,50±0,50	1,22±0,01	49,3

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.5.2. Boscalidin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Boscalidin farklı konsantrasyonlarının erkek donörden alınan periferal kan lenfositleri ile 28 saat muamele edilmesi sonucu oluşan genotoksik ve sitotoksik parametrelere ilişkin veriler çizelge 18'de verilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 0,25 µg/ml'den itibaren MNL ve BNMN frekanslarında artma görülmüştür (Şekil 34). Ancak konsantrasyon artışına bağlı olarak MNL ve BNMN oluşumunda lineer bir artış görülmemiştir. Özellikle boscalidin çalışmada değerlendirilen yüksek konsantrasyonlarında MNL ve BNMN frekanslarının sabit kaldığı veya azaldığı görülmüştür. Ancak bu azalma çözücü kontrolün neden olduğu MNL ve BNMN frekansı kadar olmamıştır. Boscalidin bazı konsantrasyonlarının BN hücrelerde birden fazla MN oluşumuna da neden olduğu görülmüştür. Wilcoxon eşleştirilmiş testi BNMN frekansı bakımından iki deney arasında bir fark olmadığını göstermiştir ($p=0,26$).

1 µg/ml boscalid dışındaki diğer konsantrasyonların NPB oluşumuna neden olduğu ve çözücü kontrol NPB frekansından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte boscalidin 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ve 6,0 µg/ml konsantrasyonlarının NBUD oluşumuna neden olduğu görülmüştür. NPB ve NBUD frekansları dikkate alındığında konsantrasyon artışı ile birlikte lineer bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Boscalidin artan konsantrasyonları ile birlikte hücre bölünme indeksi göstergesi olan CBPI'de azalma görülmüştür. CBPI ile artan konsantrasyon arasında elde edilen negatif korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($R^2=-0,82$, $p<0,01$). Test edilen konsantrasyonlar ile çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerlerine bağlı olarak hesaplanan sitotoksisitenin artan konsantrasyonlar ile birlikte arttığı ve en yüksek konsantrasyon olan 6 µg/ml'de %51,7 olduğu saptanmıştır.



Şekil 34. Boscalidin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 18. Boscalidin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

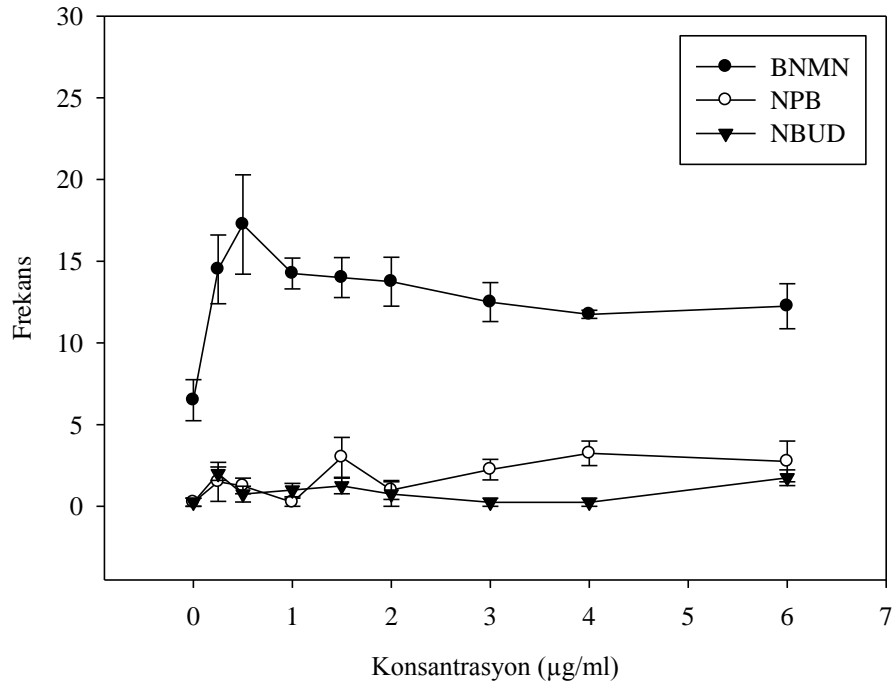
Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	203	8	1	0	0	222	111±6,00	212	106±2,50	2000	1,00±1,00	0,00±0,00		
DMSO (< % 1 v/v)	15	1	0	0	0	17	8,50±0,50	16	8,00±1,00	2000	0,50±0,50	0,50±0,50	1,36±0,04	
0,25	30	3	2	0	0	42	21,0±4,00	35	17,5±2,50	2000	3,00±2,00	2,50±0,50	1,30±0,03	15,2
0,5	32	3	2	1	1	53	26,5±8,50	39	19,5±4,50	2000	1,50±0,50	0,50±0,50	1,27±0,02	25,5
1	25	4	0	0	0	33	16,5±3,00	29	14,5±2,00	2000	0,00±0,00	1,00±1,00	1,27±0,04	23,7
1,5	21	2	1	0	0	28	14,0±2,00	24	12,0±1,00	2000	2,50±1,50	2,00±0,00	1,25±0,03	30,5
2	27	2	0	0	0	31	15,5±3,50	29	14,5±3,50	2000	1,00±1,00	1,50±1,50	1,26±0,01	27,8
3	20	1	0	1	1	31	15,5±3,50	23	11,5±0,50	2000	1,50±0,50	0,00±0,00	1,22±0,02	39,4
4	22	1	1	0	0	27	13,5±0,50	24	12,0±0,00	2000	3,50±1,50	0,00±0,00	1,21±0,01	42,7
6	22	1	0	0	0	24	12,0±3,00	23	11,5±2,50	2000	1,00±1,00	1,00±0,00	1,17±0,01	51,8

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

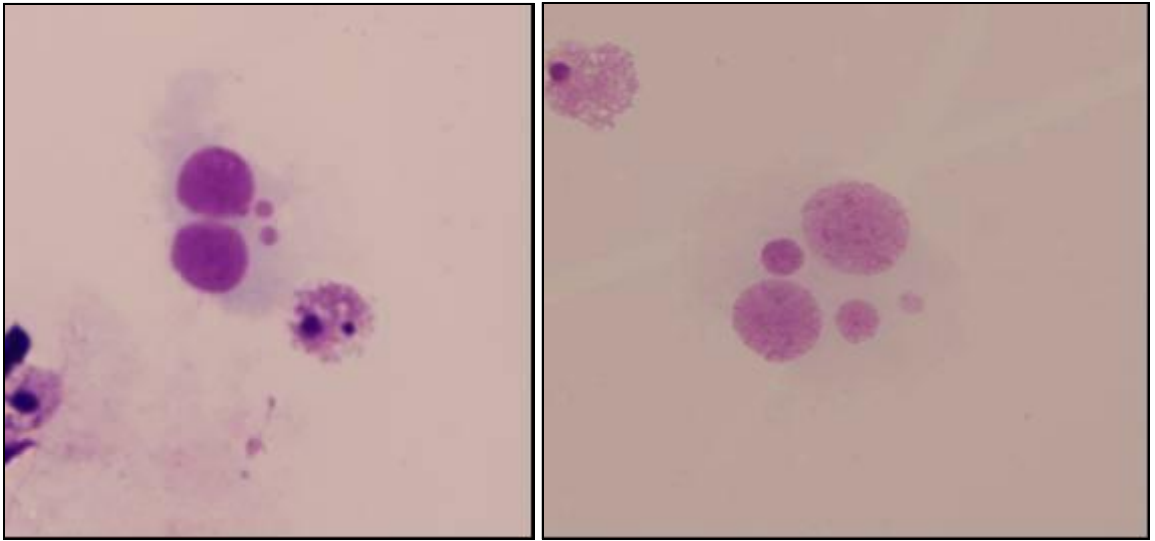
4.1.5.2. Boscalidin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Total olarak 4000 BN hücrenin değerlendirilmesi sonucu boscalidin farklı konsantrasyonlarının neden olduğu genotoksisite ve sitotoksisiteye ilişkin veriler çizelge 19'da verilmiştir. Muamele konsantrasyonlar çözücü kontrolden daha fazla MN oluşumuna neden olmuştur (Şekil 35). Boscalidin farklı konsantrasyonlarının BN hücrelerde birden fazla MN oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Elde edilen MNL ve BNMN frekansları dikkate alındığında çizilen grafikte görüleceği üzere boscalidin düşük konsantrasyonlarından (0,25 ve 0,5 µg/ml) sonra MN frekansının azaldıktan sonra belli bir düzeyde sabit kaldığı görülmüştür. Bu durum, MNL ve BNMN frekanslarına uygulanan lineer regresyon analizi sonuçlarında da görülmüştür. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda MN frekansında azalma görülmesine rağmen çözücü kontrolden daha yüksek olduğu görülmüştür. BNMN frekansları dikkate alındığında cinsiyetler arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (Mann Whitney *U*, $p>0,05$).

Boscalidin test edilen konsantrasyonları NPB ve NBUD oluşumlarına neden olmuşlardır. Boscalid ile muamele edilen lenfositlerde elde edilen NPB frekansları, çözücü kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde bazı konsantrasyonlar için elde edilen NBUD frekanslarının çözücü kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür. Boscalidin siklusta ilerleyen lenfositlerde hücre siklusu bölünme kinetiğini etkilediği tespit edilmiştir. Test edilen konsantrasyonlar CBPI değerlerinin azalmasına neden olmuş, azalmanın lineer ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($R^2=-0,81$, $p<0,01$). Muamele konsantrasyonlar ve çözücü kontrol için elde edilen CBPI değerleri göz önüne alındığında boscalidin 6 µg/ml konsantrasyonunun siklusta ilerleyen lenfositler %50,7 sitotoksisite oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 35. Boscalidin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)



Şekil 36. 6 µg/ml boscalid ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan 2 ve 3 mikronukleuslu binukleat hücreler

Çizelge 19. Boscalidin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL	BNMN	% BNMN	Toplam Binukleat	% NPB	% NBUD	CPBI	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	417	10	1	0	0	440	***110±3,81	428	***107±3,77	4000	0,50±0,50	0,25±0,25	-	-
DMSO (< %1 v/v)	23	3	0	0	0	29	7,25±1,11	26	6,50±1,26	4000	0,25±0,25	0,25±0,25	1,39±0,03	-
0,25	52	3	2	0	1	69	*17,3±3,07	58	14,5±2,18	4000	1,50±1,19	2,00±0,41	1,32±0,02	18,4
0,5	60	5	2	1	1	85	*21,3±4,87	69	*17,3±2,04	4000	1,25±0,48	0,75±0,48	*1,29±0,02	26,8
1	51	5	0	0	0	62	15,3±1,56	56	*14,0±1,00	4000	0,25±0,25	1,00±0,41	*1,29±0,03	26,7
1,5	50	4	2	0	0	64	16,0±1,63	56	*14,0±1,23	4000	3,00±1,22	1,25±0,48	**1,28±0,02	29,1
2	50	5	0	0	0	60	15,0±1,58	55	13,8±1,49	4000	1,00±0,58	0,75±0,75	**1,28±0,02	29,0
3	47	1	0	1	1	58	14,5±1,85	50	12,5±1,35	4000	2,25±0,63	0,25±0,25	***1,25±0,02	37,7
4	44	2	1	0	0	51	12,8±0,71	47	11,8±0,25	4000	3,25±0,75	0,25±0,25	***1,23±0,02	41,5
6	40	7	1	1	0	61	15,3±2,90	49	12,3±1,38	4000	2,75±1,25	1,75±0,48	***1,19±0,01	50,7

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi
MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi
CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

***p<0,001

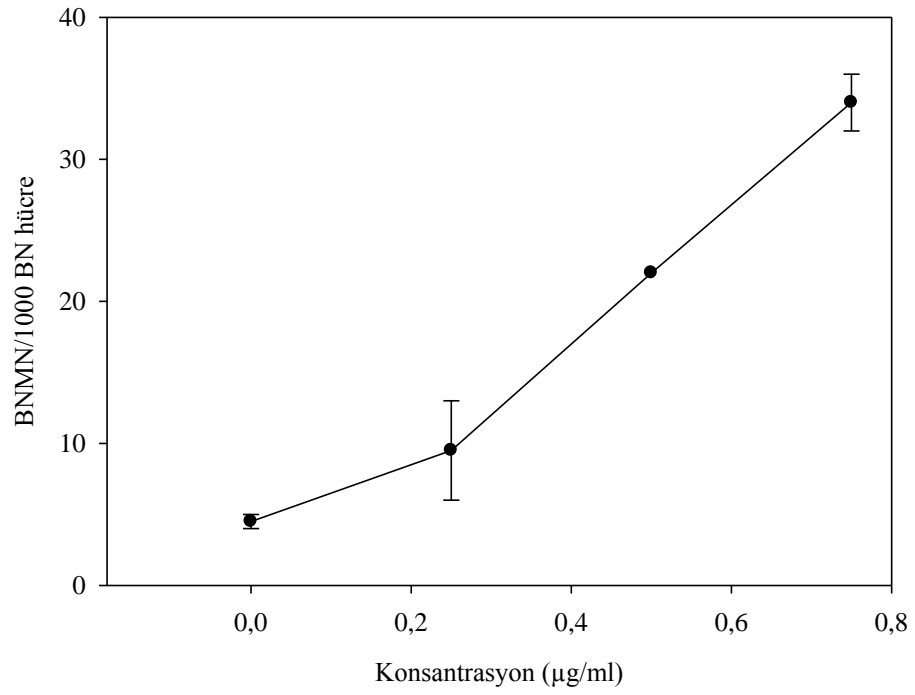
4.1.6. Pyraclostrobinin Siklusta İlerleyen İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

4.1.6.1. Pyraclostrobinin Bayan Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinin 28 saat pyraclostrobinin ile muamele edilmesi sonucu elde edilen genotoksisite ve sitotoksisiteye ilişkin veriler çizelge 20'de verilmiştir. Çalışmada 1 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda pyraclostrobinin yüksek sitotoksisitesi nedeni ile yeterli sayıda BN hücre oluşmadığı için değerlendirilmeye alınmamışlardır. Gerçekleştirilen her iki deneyde pyraclostrobinin MN oluşumuna neden olduğu ve çözücü kontrole göre daha fazla sayıda MN oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 37). Konsantrasyon artışına bağlı olarak MN oluşumunda artış gözlenmiştir. BNMN dikkate alındığında, lineer regresyon analizi sonuçları konsantrasyon ile MNL ve BNMN frekansı arasında lineer bir ilişki olduğunu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir (MNL için $R^2=0,94$, $p<0,05$, BNMN için $R^2=0,97$, $p<0,05$). MNL ve BNMN frekansları dikkate alındığında Wilcoxon eşleştirilmiş testi, yapılan iki deney arasında bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Pyraclostrobinin çalışmada değerlendirilen konsantrasyonları MN oluşumu ile birlikte lenfositlerde NPB ve NBUD oluşturduğu görülmüştür. Artan konsantrasyonlara bağlı olarak NPB oluşumunda artış görülmüştür. Lineer regresyon analizi, konsantrasyon ile NPB oluşumunun lineer bir ilişkiye sahip olduğunu göstermiştir ($R^2=0,99$, $p<0,001$). Benzer şekilde pyraclostrobinin artan konsantrasyonları ile birlikte NBUD oluşumu da artmıştır. Ancak doza bağlı lineer bir artış görülmemiştir ($R^2=0,74$, $p>0,05$).

Pyraclostrobin muamelesi lenfosit kültüründe hücrelerin bölünme kinetiklerini etkilemiştir. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında pyraclostrobinin CBPI'de azalmaya neden olduğu görülmüştür. Artan konsantrasyonlar ile azalan CBPI değerleri arasında lineer ve istatistiksel açıdan önemli ilişki olduğu saptanmıştır ($R^2=-0,91$, $p<0,05$). Çalışmada değerlendirilen muamele konsantrasyonları ile çözücü kontrole ait CBPI verileri değerlendirildiğinde en yüksek konsantrasyonun (0,75 µg/ml) siklusta ilerleyen lenfositlerde %61,4 sitotoksisiteye neden olduğu görülmüştür.



Şekil 37. Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 20. Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksosite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	230	5	0	0	0	240	120±20,0	235	118±18,5	2000	1,50±1,50	1,50±1,50	-	-
DMSO (< %1 v/v)	9	0	0	0	0	9	4,50±0,50	9	4,50±0,50	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,38±0,01	-
0,25	18	1	0	0	0	20	10,0±3,00	19	9,50±3,50	2000	12,5±0,50	3,50±2,50	1,24±0,02	35,8
0,50	44	0	0	0	0	44	22,0±0,00	44	22,0±0,00	2000	23,50±1,50	6,00±0,00	1,21±0,01	44,9
0,75	54	12	2	0	0	84	42,0±0,00	68	34,0±2,00	2000	34,50±1,50	22,0±4,00	1,15±0,02	61,4

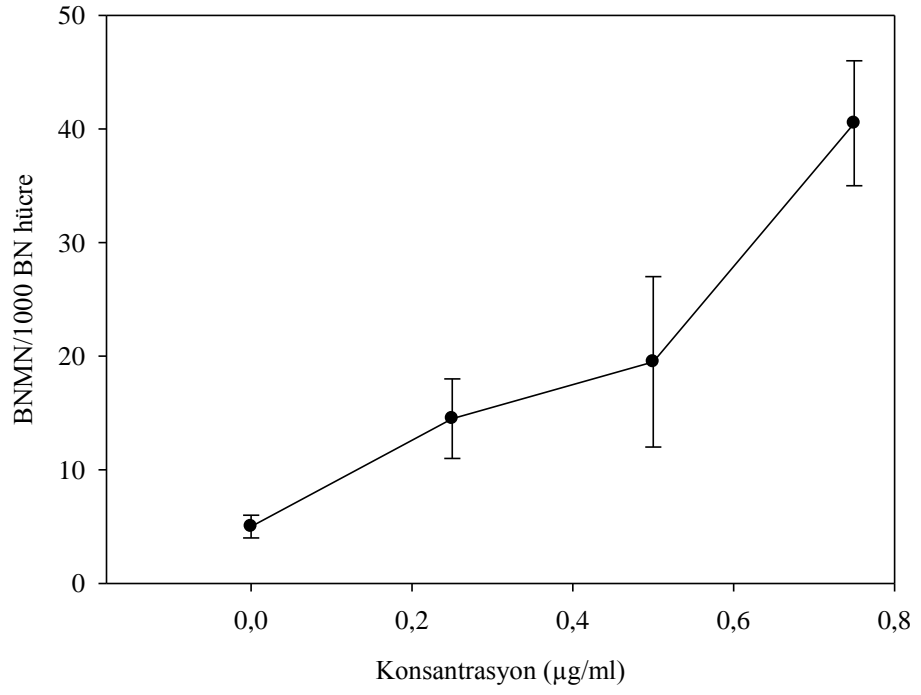
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.6.2. Pyraclostrobinin Erkek Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

Erkek donörden alınan periferal kan lenfosilerinin 28 saat süre pyraclostrobin ile muamele edilmesi MN oluşumuna neden olmuş ve elde edilen değerlerin çözücü kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 21). Çalışmada pyraclostrobinin 1 µg/ml ve üzeri konsantrasyonları da değerlendirilmiş ancak yüksek sitotoksisite nedeni ile yeterli sayıda BN hücre oluşmadığı için değerlendirilmemişlerdir. Pyraclostrobinin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak MNL ve BNMN frekanslarında artış olduğu saptanmıştır (Şekil 38). Lineer regresyon analizi sonuçları konsantrasyon artışına bağlı olarak MNL ve BNMN frekanslarında lineer bir şekilde artış medya geldiği ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (MNL için $R^2=0,96$, $p<0,05$, BNMN için $R^2=0,92$, $p<0,05$). Wilcoxon eşleştirilmiş testi yapılan iki deney arasında bir fark olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Pyraclostrobin insan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumunun yanında NPB ve NBUD oluşumuna da neden olmuştur. Her iki deneyden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde konsantrasyon artışı ile birlikte NPB frekansında artış görülmüştür. Bu artışın konsantrasyona bağlı olarak lineer bir şekilde arttığı görülmüştür ($R^2=0,99$, $p<0,001$). Benzer şekilde pyraclostrobinin değerlendirilen konsantrasyonlarının NBUD oluşumuna neden olduğu ve konsantrasyon ile birlikte arttığı, bu artışın konsantrasyona bağlı lineer bir şekilde olduğu görülmüştür ($R^2=0,92$, $p<0,05$).

Bayan donör periferal kan lenfositlerinde elde edilen sonuçlara benzer olarak pyraclostrobinin sitotoksik olduğu, konsantrasyon artışı ile birlikte CBPI değerlerinde azalma meydana geldiği ancak bu azalmanın doz ile lineer bir ilişkisi olmadığı görülmüştür ($R^2=-0,85$, $p>0,05$). Pyraclostrobinin en yüksek konsantrasyonun siklusta ilerleyen lenfositlerde %50,1 sitotoksisiteye neden olduğu ve bu değerlerin bayan donörden elde edilen değerden düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 38. Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)

Çizelge 21. Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu ‰ MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve ‰ sitotoksisite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	‰ MNL±SH	BNMN	‰ BNMN±SH	Toplam Binukleat	‰ NPB±SH	‰ NBUD±SH	CPBI±SH	‰ Sitotoksisite
	1	2	3	4	>4									
MMC (0,05 µg/ml)	205	5	0	0	0	215	108±2,50	210	105±5,00	2000	7,50±2,50	0,00±0,00	-	-
DMSO (< %1 v/v)	10	0	0	0	0	10	5,00±1,00	10	5,00±1,00	2000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,28±0,02	-
0,25	26	2	1	0	0	33	16,5±2,50	29	14,5±3,50	2000	17,5±1,50	3,50±0,50	1,20±0,03	28,7
0,50	33	5	0	0	1	48	24,0±10,0	39	19,5±3,50	2000	20,5±6,50	9,50±4,50	1,21±0,02	26,0
0,75	74	7	0	0	0	88	44,0±6,00	81	40,5±5,50	2000	46,0±4,00	18,0±8,00	1,14±0,00	50,1

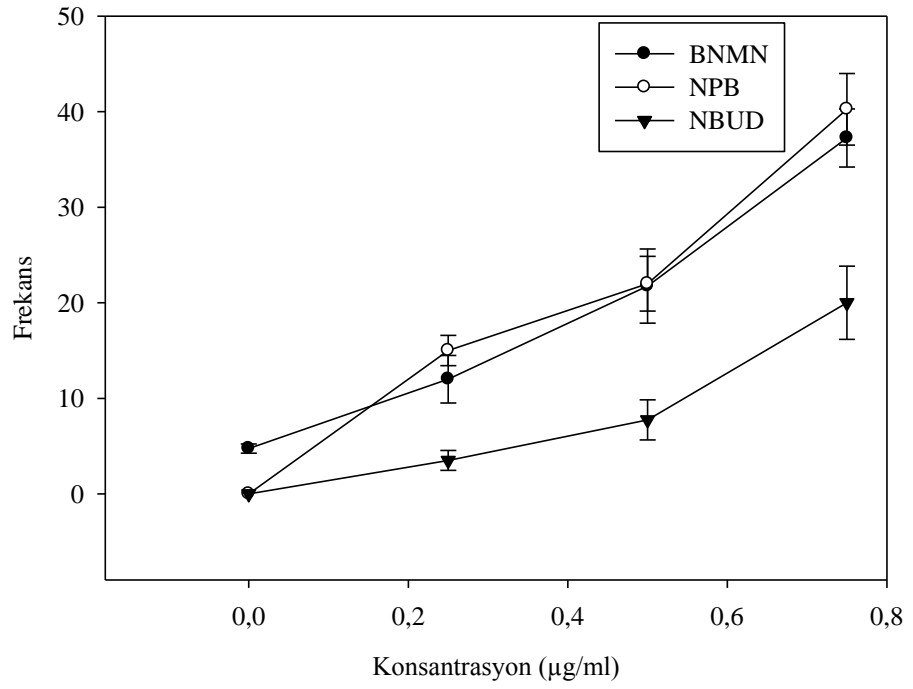
MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi,

4.1.6.3. Pyraclostrobinin İki Donörden Alınan Periferal Kan Lenfositlerinde Oluşturduğu Genotoksisite

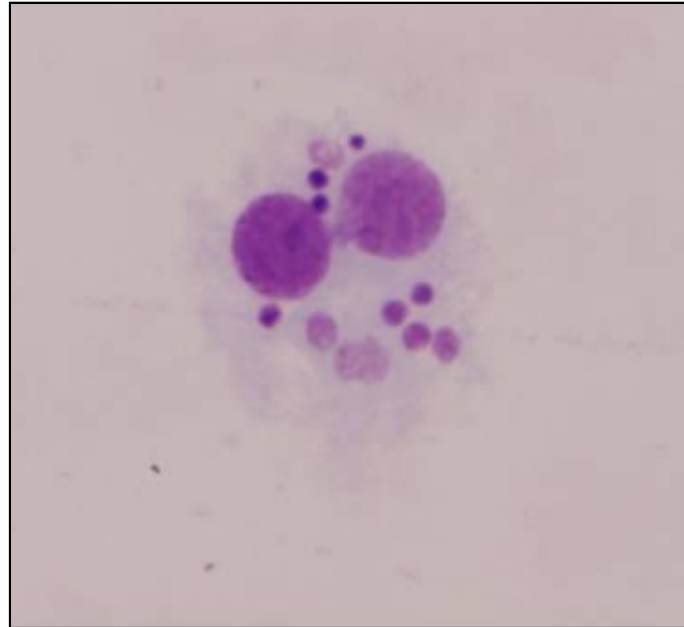
Total olarak 4000 BN hücrenin değerlendirilmesi sonucu pyraclostrobinin test edilen konsantrasyonlarının genotoksik özellik gösterdiği saptanmıştır. Çalışmada 1-8 µg/ml aralığındaki pyraclostrobinin ile muamele edilen lenfosit kültürlerde yeterli sayıda BN hücre oluşmadığı için değerlendirmeye alınmamıştır. Artan konsantrasyonlarla birlikte MN oluşumu artmıştır (Çizelge 22). Bununla birlikte pyraclostrobin ile muamele edilen lenfositlerde birden fazla MN içeren BN hücreler de olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 39). MNL ve BNMN frekansları dikkate alındığında artan konsantrasyonlara bağlı olarak MN frekansında artış görülmüş ve bu ilişkinin lineer olduğu saptanmıştır (MLN için $R^2=0,97$ $p<0,05$, BNMN için $R^2=0,97$ $p<0,05$). Ayrıca BNMN frekansları dikkate alındığında cinsiyetler arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (Mann Whitney U, $p>0,05$).

MN oluşumu ile birlikte pyraclostrobin her iki donöre ait lenfositlerde NPB oluşumuna neden olmuş, artan konsantrasyonları ile birlikte NPB oluşumu da artmıştır. Lineer regresyon analizi sonuçları, konsantrasyon ile NPB frekansı arasında lineer bir ilişkinin olduğunu göstermiştir ($R^2=0,97$, $p<0,05$). Benzer şekilde pyraclostrobinin çeşitli konsantrasyonları lenfosit kültürde NBUD oluşuma neden olmuş, konsantrasyon artışı ile birlikte hücrede oluşan NBUD frekansı da artmıştır. Lineer regresyon analizi konsantrasyon ile NBUD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermiştir ($R^2=0,97$, $p<0,05$).

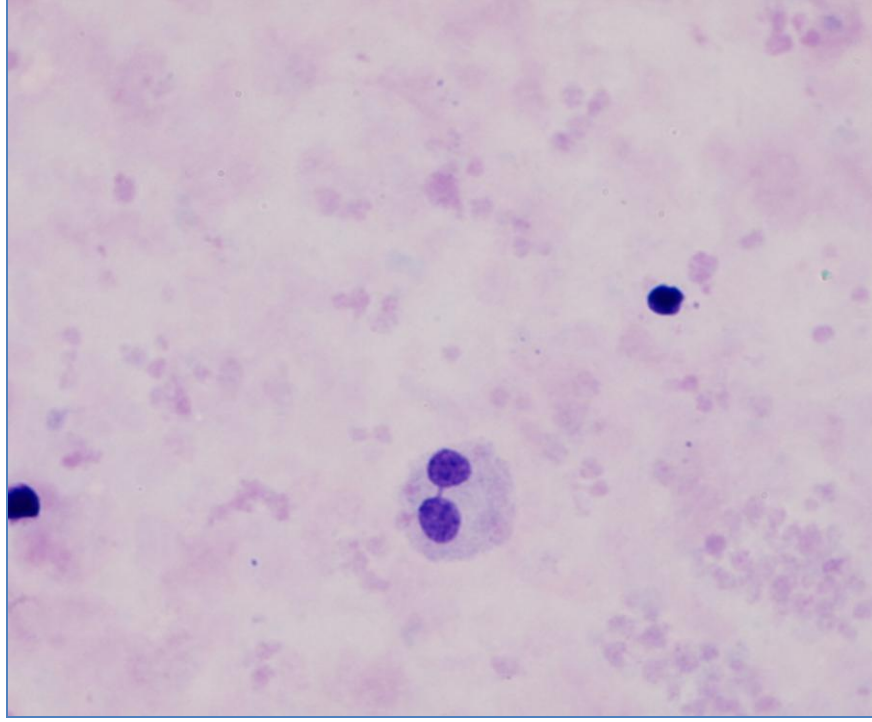
Pyraclostrobin ile muamele edilen lenfositlerde hücre bölünme yetenekleri azalmıştır. Her iki donöre ait veriler değerlendirildiğinde, CBPI değerlerinin konsantrasyon artışı ile birlikte azaldığı görülmüştür. Lineer regresyon analizi bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($R^2=-0,88$, $p>0,05$). Muamele edilen gruplar ile çözücü kontrole ait CBPI değerleri dikkate alındığında 0,75 µg/ml pyraclostrobinin lenfosit kültürde %56,6 oranında sitotoksisiteye neden olduğu görülmüştür.



Şekil 39. Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH)



Şekil 40. 0,5 µg/ml pyraclostrobin ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan onbir mikronukleuslu binukleat hücre



Şekil 41. 1 µg/ml pyraclostrobin ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan NPB'lü binukleat hücre

Çizelge 22. Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	BN Hücrelerde MN dağılımı					MNL	% MNL±SH	BNMN	% BNMN±SH	Toplam Binukleat	% NPB±SH	% NBUD±SH	CPBI±SH	% Sitotoksisite
	1	2	3	4	5									
MMC (0,05 µg/ml)	435	10	0	0	0	455	114±8,99	445	111±8,62	4000	4,50±2,10	0,75±0,75	-	-
DMSO (< %1 v/v)	19	0	0	0	0	19	4,75±0,48	19	4,75±0,48	4000	0,00±0,00	0,00±0,00	1,33±0,03	-
0,25	44	3	1	0	0	53	13,3±2,46	48	12,0±2,48	4000	15,0±1,58	3,50±1,04	1,22±0,02	32,8
0,50	77	5	0	0	1	92	23,0±4,12	83	20,8±3,88	4000	22,0±2,86	7,75±2,10	**1,21±0,01	36,9
0,75	128	19	2	0	0	172	**43,0±2,52	149	**37,3±3,04	4000	***40,3±3,75	***20,0±3,83	**1,14±0,01	56,6

MNL: Toplam mikronukleus sayısı, BNMN: Mikronukleus içeren binukleat hücre sayısı, NPB: Nukleoplazmik köprü, NBUD: Nuklear tomurcuk, CBPI: Sitokinez-bloklama proliferasyon indeksi

MNL, BNMN, NPB ve NBUD için Kruskal-Wallis test- Dunn's çoklu karşılaştırma testi

CBPI için Tek yönlü varyans analizi- Dunnett's çoklu karşılaştırma testi

*p<0,05

**p<0,01

***p<0,001

4.2. Tartışma

Genomik kararsızlığın indikatörlerinden birisi de MN'dir. MN normalde de bazı dokularda görülebilmeye rağmen (Heddle, 1990) çoğu zaman genotoksik ajanlara maruz kalma sonucu oluştuğu kabul edilmekte (Heddle 1991; Smith 1993; Muller-Tegethoff 1997) bundan dolayı mutajen (Russo ve Levis, 1991) veya karsinojenlere maruziyetin bir göstergesi olarak kabul görmektedir (Trizna 1992; Tucker 1996).

Pestisit formülasyonlarında, aktif maddelerinin dışında birçok inert içeriğin (çözücü, seyreltici, emülgatör, etkinliğini arttıran maddeler) bulunduğu ve çoğu zaman üretici firmalar tarafında gizlendiği bildirilmiştir (Zeljezic ve Garaj-Vrhovac, 2004). Pestisit üretiminde çalışan veya uygulayan kişiler, aktif maddeler ile birlikte çoğu zaman pestisit formülasyonunda kullanılan başka kimyasal gruplara da maruz kalmaktadırlar. Yapılan çalışmalar inert içeriğin çoğu zaman genetik stabilite için risk taşıdığını göstermiştir (Zeljezic ve Garaj-Vrhovac, 2004). Bundan dolayı genotoksisite bakımından boscalid ve pyraclostrobinin ile birlikte ticari olarak satılan signumun da değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmüştür.

Pestisitlerin ticari formları ile ilgili olarak yapılan birçok çalışmada genotoksik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir. Ticari olarak satılan fungusit conan 5FL'nin (aktif madde olarak 50 g/L hexaconazole bulunmakta) insan periferel kan lenfositleri ile fare kemik iliğinde oluşturduğu genotoksisite ve sitotoksisite çalışmasında, conan 5FL'nin en düşük konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonların her iki sistemde önemli sayılacak KA'lara neden olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte test edilen bütün konsantrasyonların önemli derecede KKD frekansında artışa neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca conan 5FL'nin konsantrasyon artışına bağlı olarak mitotik indekste azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2008). Bir başka çalışmada, aktif madde olarak triasulfuranın kullanıldığı logran herbisidinin insan periferel kan lenfositlerinde KA'larını arttırdığı ve mitotik indeksi düşürdüğü dolayısı ile genotoksik (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µg/ml) ve sitotoksik (16-256 µg/ml) özellik gösterdiği bildirilmiştir (Muranlı ve Kaymak, 2004). Yine Soloneski ve ark. (2001) tarafından dithiocarbamat bir fungusit zineb ile ticari formu azzurronun insan periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisite araştırılmıştır. 0,1-100 µg/ml aralığındaki konsantrasyonları değerlendirilen her iki ürünün *in vitro* koşullarda KKD frekansını çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte her iki ürünün doza bağlı olacak şekilde anormal hücre, kromatid ve

kromozom tip aberasyonlar ile total aberasyon sayısında artmaya sebep olduğu bildirilmiştir.

Bolognesi ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada bir herbisit olan glyphosate (*N*-phosphonomethylglycine) ile ticari formu olan roundupun *in vivo* ve *in vitro* genotoksik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Glyphosate ve roundupun insan periferal kan lenfositlerinde KKD değişimini önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca her iki kimyasalın fare kemik iliği hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede MN artışına neden olduğu belirtilmiştir. Sivikova ve Dianovský (1999b) tarafından ticari olarak satılan herbisit modownun (aktif madde bifenox) kültüre edilmiş sığır periferal kan lenfositleri ile 24 saat muamele sonucunda, 25-250 µg/ml konsantrasyon aralığının KA'larını az miktarda arttırdığı, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda ise KA frekansının çözücü kontrole göre azaldığı bildirilmiştir. 250 ve 500 µg/ml konsantrasyonda KKD frekansında istatistiksel olarak önemli artış görülmekle birlikte mitotik ve bölünme indekslerinde de azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Ancak, 48 saat süreyle uygulanan pestisidin lenfositler üzerine herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Scassellati-Sforzolini ve ark. (1997) tarafından bir herbisit olan linuron ile linuronun kullanıldığı ticari formun genotoksik aktivitesi *in vivo* koşullarda incelenmiştir. Linuron ve ticari formunun çeşitli konsantrasyonları ile ayrı ayrı beslenen sıçan gruplarında yapılan çalışmada kısmen de olsa genotoksikite açısından farklılık bulunmuştur. Bu farklılığın linuronun ticari formunda yer alan ve biyolojik aktivitesi olan başka kimyasallardan olabileceği bildirilmiştir.

Görüldüğü gibi, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çeşitli hücre ve test sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ticari olarak satılan birçok pestisitinin genotoksik ve sitotoksik aktivitelerinin olduğu ortaya konulmuştur. Mitoz bölünmeye sevk edilmeyen, G₀ fazındaki insan periferal lenfositlerinin 24 saat signumun çeşitli konsantrasyonları ile muamelesi sonucu, BNMN ve MNL frekansları genel olarak çözücü kontrole göre artmıştır. Signumun 2, 6 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında BNMN frekansı çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Benzer şekilde MNL frekansında da artış meydana gelmiş ancak signumun yalnızca 2, 6 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan önemli MNL artışına neden olduğu saptanmıştır.

Diğer taraftan signumun farklı konsantrasyonlarının siklusta ilerleyen lenfositlerde oluşturduğu genotoksikitenin değerlendirilmesi amacıyla lenfositlerin 28 saat süre ile muamelesi sonucunda BNMN ve MNL frekansları genel olarak çözücü kontrole göre artmıştır. Signumun farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu bu artışlar G₀ fazı lenfositlerinde elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiş, bazı konsantrasyonların neden

olduğu MN frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Signumun 0,5, 1, 1,5, 3 µg/ml konsantrasyonlarının oluşturduğu MNL frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Benzer şekilde 0,5, 1, 1,5, 3 µg/ml signumun oluşturduğu BNMN frekanslarının çözücü kontrole göre istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmıştır. Her iki muamele şekli düşünüldüğünde genel olarak signumun yüksek sitotoksikite oluşturan konsantrasyonlarda MNL ve BNMN frekanslarının azaldığı görülmüştür. Ancak bu azalma hiçbir zaman çözücü kontrolden elde edilen değerler kadar olmamıştır.

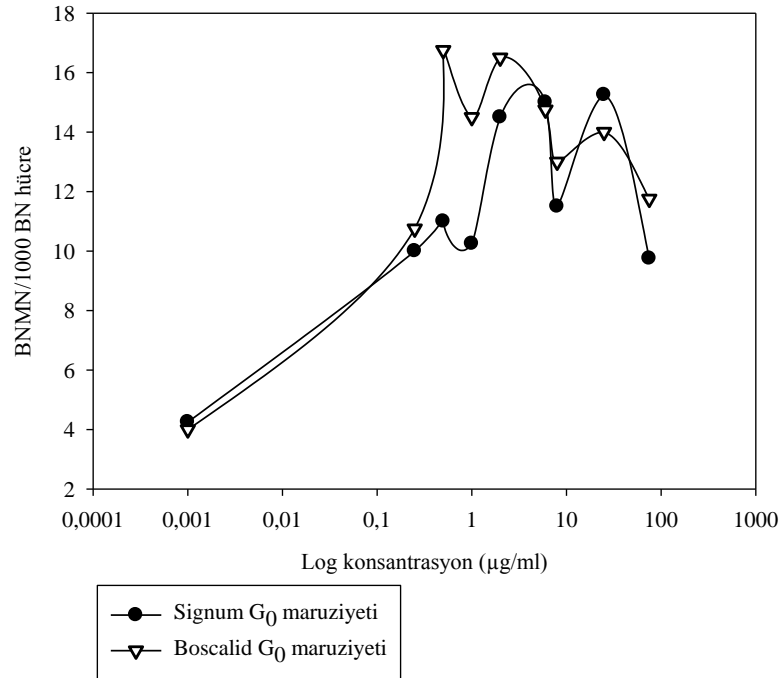
Şimdiye kadar boscalid ve pyraclostrobinin ticari şekli olan signum fungusitinin genotoksik ve sitotoksik aktivitesini insan periferik kan lenfositlerinde araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen signuma ait sonuçlar çeşitli test sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen başka ticari pestisit formlarına ait genotoksikite verileri ile uyum göstermektedir. Her iki muamele şekli göz önüne alındığında ticari form olan signumun test edilen bazı konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre anlamlı sayıda MN artışı bu fungusitinin genotoksik aktivitesi olduğu düşüncesini desteklemektedir.

G₀ fazında bulunan insan periferik lenfositlerinin boscalidin farklı konsantrasyonları ile 24 saat süre muamele edilmesi sonucu MNL ve BNMN frekansları çözücü kontrole göre artmıştır. Çalışmada değerlendirilen konsantrasyonlar arasında 0,5 ve 2 µg/ml'nin neden olduğu BNMN frekansı istatistiksel olarak çözücü kontrole göre anlamlı bulunmuştur. Diğer konsantrasyonların neden olduğu BNMN frekansları istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur. Ancak bu artışlar konsantrasyon artışına bağlı olmamış, özellikle yüksek konsantrasyonlarda BNMN frekansında azalma görülmüştür. Benzer şekilde elde edilen bazı MNL frekanslarının çözücü kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Ancak 2 µg/ml boscalidin bulunduğu kültürlerden elde edilen MNL frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.

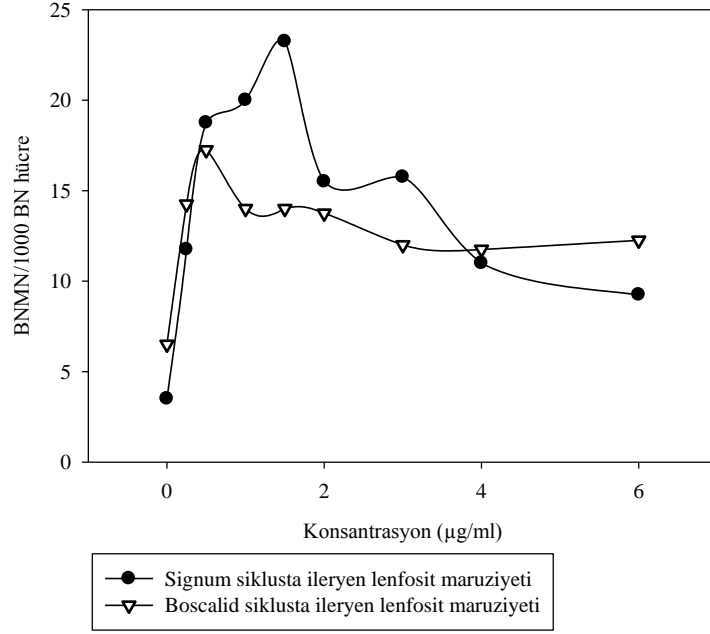
Boscalidin farklı konsantrasyonları siklusta ilerleyen lenfositlerde MN oluşumunu indüklemiştir. Çözücü kontrol ile karşılaştırıldığında MNL frekansları artmıştır. 0,25 ve 0,5 µg/ml boscalidin bulunduğu lenfosit kültürlerinde elde edilen MNL frekanslarının çözücü kontrole göre istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır. Bu iki konsantrasyon dışındaki konsantrasyonlar MN oluşumuna neden olmuş ancak istatistiksel olarak farklı bulunmamışlardır. Boscalidin 0,5, 1 ve 1,5 µg/ml konsantrasyonlarının neden olduğu BNMN frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Test edilen

diğer konsantrasyonlar çözücü kontrolden daha fazla BNMN oluşumuna neden olmuşlardır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları saptanmıştır.

Boscalid ile muamele edilen G_0 fazı ve siklusta ilerleyen lenfositlerde oluşan MNL ve BNMN frekansları genel olarak signumun etki tarzına benzemektedir (Şekil 42, 43). Her iki fungusit genel olarak test edilen düşük konsantrasyonlarda daha fazla MN oluşumuna neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda bu oluşum azalmıştır. Signumun G_0 fazında bulunan lenfositlerde oluşturduğu MNL ve BNMN frekansları ile boscalidin aynı fazda bulunan lenfositlerde oluşturduğu MNL ve BNMN frekansları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Mann whitney U , $p>0,05$). Aynı karşılaştırmalar siklusta ilerleyen lenfositler için yapılmıştır. Buna göre signum ile boscalidin siklusta ilerleyen lenfositlerde oluşturduğu MNL ve BNMN frekansları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığını görülmüştür (Mann whitney U , $p>0,05$). Ayrıca her iki fungusit için elde edilen MNL ve BNMN frekansları arasında anlamlı korelasyon olduğu saptanmıştır. (MNL için $R=0,75$, $p<0,05$, BNMN için $R=0,77$, $p<0,05$). Elde edilen grafik ve istatistiksel sonuçlar, signum ile boscalidin *in vitro* lenfosit kültürde oluşturdukları MN oluşumları bakımından aralarında bir fark olmadığını ve dolayısı ile benzer özelliklere sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 42. Signum ve boscalid ile muamele edilen G_0 fazı lenfositlerinde elde edilen BNMN frekanslarının karşılaştırılması



Şekil 43. Signum ve boscalid ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde elde edilen BNMN frekanslarının karşılaştırılması

Yapılan araştırmalar sonucu boscalidin genotoksik ve mutajenik özellikleri ile ilgili literatüre rastlanmamıştır. EPA (2003) tarafından yayınlanan bildiride boscalidi üreten firma tarafından bildirilen veriler dışından veriye rastlanmamıştır. Bununla birlikte farklı hücreler kullanılarak yapılan farklı testlere ait genotoksik veriler olmasına rağmen insan periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisite ve sitotoksisiteye ilişkin veriler bulunmamaktadır. EPA (2003), boscalidin ames testi ile metabolik aktivasyonun varlığında veya yokluğunda 5000 µg/petri kadar negatif sonuç verdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte CHO hücrelerinde CHO/HPRT mutajenite testinde, Chinese hamster V79 hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* KA yöntemi, fare MN oluşum yöntemi ve sıçan primer hepatositlerde UDS testlerinde genotoksik olmadığı bildirilmiştir (EPA, 2003). EPA tarafından bildirilen negatif sonuçların aksine bu çalışmada boscalidin insan periferel kan lenfositlerinde genotoksik etki oluşturduğunu söylemek mümkündür. Her iki muamele şekli incelendiğinde doza bağlı bir artış olmamasına rağmen bütün konsantrasyonlarda meydana gelen MN artışının çözücü kontrole göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuş olması bu düşüncüyü desteklemektedir.

Pyraclostrobinin farklı konsantrasyonları ile G₀ fazında bulunan insan periferel lenfositlerinin 24 saat süreyle muamelesi MN oluşumuna neden olmuştur. Elde edilen MNL ve BNMN frekansları çözücü kontrole göre yüksek bulunmuştur. Pyraclostrobinin 1,5 ve 2 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edilen kültürlerde elde edilen MNL

frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde pyraclostrobinin 0,5, 1,5 ve 2 µg/ml konsantrasyonları lenfosit kültürde çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olan BNMN artışına neden olmuştur. Signum ve boscalidde olduğu gibi bu kimyasalın da test edilen yüksek konsantrasyonlarında MNL ve BNMN frekanslarında azalma görülmüştür.

Pyraclostrobin, boscalid ve signumun aksine, siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Dolayısı ile sadece pyraclostrobinin 3 farklı konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Pyraclostrobinin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak MN oluşumu artmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 0,75 µg/ml'nin eklendiği lenfosit kültürde elde edilen MNL frekansı çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Benzer şekilde BNMN frekansı da konsantrasyon artışı ile birlikte artmış ve yine pyraclostrobinin en yüksek konsantrasyonu olan 0,75 µg/ml çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı BNMN artışına neden olmuştur. Pyraclostrobin G₀ fazı ve siklusta ilerleyen lenfositler ile muamele edildiğinde farklı genotoksik özellik göstermiştir. G₀ fazı lenfositler ile karşılaştırıldığında siklusta ilerleyen lenfositler daha fazla sayıda MN oluşumu görülmüştür.

Bony ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada pyraclostrobin ile taşıdığı özellikler nedeni ile aynı grupta yer alan azoxystrobinin genotoksik özelliği zebra balığı somatik (karaciğer), germ (spermatozoa) hücreleri ile eritrositlerde araştırılmıştır. Bu çalışmada azoxystrobinin tarımda kullanılan konsantrasyonu 20 L su bulunan bir ortama eklenmiş ve 7, 14 ve 21 gün sonra meydana gelen genotoksisite eritrositlerdeki MN frekansı ile karaciğer ve üreme hücrelerindeki ise comet yöntemi ile tespit edilmiştir. Buna göre, azoxystrobin ilk hafta sonundan itibaren MN oluşumuna neden olmuştur. 3 hafta sonunda MN frekansında artma görülmüş ve elde edilen MN frekanslarının çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Ayrıca comet yöntemi sonuçları maruz kalma süresini artması ile karaciğer hücrelerinde meydana gelen genotoksik hasarın çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu göstermiştir. Benzer şekilde azoxystrobin spermatozoalarda da genotoksik etki göstermiş ve maruz kalınan süre ile DNA hasarı artmıştır. Comet sonuçları karaciğer hücrelerinde meydana gelen hasarın spermatozoalardan daha fazla olduğunu göstermiştir.

Bony ve ark. (2008) tarafından, pyraclostrobin ile aynı grupta yer alan azoxystrobinin de bulunduğu pestisit karışımı ile kontamine olmuş nehirde yaşayan balıklarda meydana gelen genotoksisite comet yöntemi ile eritrositlerde araştırılmıştır. Nehrin yukarı ve aşağı kısımları arasında yaşayan denizalası (*Salmo trutta fario*)

larvalarında genotoksisite önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, yapay olarak yapılan kanallarda akarsu içinde yetiştirilen *Phoxinus phoxinus*, diuron ve azoxystrobinin karışımlarına maruz bırakılmışlardır. Bu iki pestisite maruz kalmamış balıklar ile karşılaştırıldığında maruz kalan balıklarlarda önemli derecede DNA hasarı (3-5 kat) meydana geldiği belirlenmiştir. Maruziyet süresi sonucunda balıklar 1 ay süre ile normal koşullarda yetiştirilmiş ve elde edilen DNA hasarının maruz kalmamış balıklarda elde edilen kadar olduğu bulunmuştur.

Pyraclostrobinin insan periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksisite ile ilgili literatüre rastlanmamıştır. Bununla birlikte yeni bir fungusit olan pyraclostrobinin genotoksik ve mutajenik özellikleri ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bartholomaeus (2003)'a göre, pyraclostrobinin *in vitro* bakteri ve memeli hücrelerde yapılan genotoksisite çalışmalarında negatif sonuç elde edildiğini bildirmiştir. Chinese hamster V79 hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada pyraclostrobinin 6,25–25 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda (S9 varlığında veya yokluğunda) kromozom hasarı oluşturmadığı bildirilmiştir. Ayrıca S9 bulunmayan 0,005–0,1 mg/ml arasındaki konsantrasyonlar ile S9 bulunan 3,125–12,5 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda da kromozom hasarı gözlemlenmemiştir. Bartholomaeus (2003)'a göre Engelhardt ve Hoffman (1998) sıçan hepatositleri ile yaptıkları program dışı DNA sentezi çalışmasında, pyraclostrobinin 0,01–0,5 mg/ml konsantrasyonlarında negatif sonuç alındığını bildirmiştir. Daha sonra aynı hücrelerde benzer bir çalışma farklı konsantrasyon aralığı (0,004–0,5 mg/ml) kullanılarak yapılmış ve sonuç yine negatif bulunmuştur. Fare kemik iliği hücreleri ile yapılan *in vivo* çalışmada pyraclostrobinin 75–300 mg/kg vücut ağırlığı aralığındaki konsantrasyonlarında MN oluşmadığı bildirilmiştir. Ancak bu çalışmada pyraclostrobinin çözücü kontrole göre daha fazla MN oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Daha önce farklı test sistemleri kullanılarak farklı hücrelerde yapılan genotoksisite çalışmalarının aksine, bu çalışmada elde edilen anlamlı MN oluşumları, pyraclostrobinin insan periferel kan lenfositlerinde genotoksik özellik gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışmada, signum ve boscalidin her iki muamele şekli ile pyraclostrobinin G₀ fazında bulunan lenfositlerle muamelesi sonucu oluşan MN frekansları konsantrasyon artışına bağlı olarak lineer bir şekilde artmamıştır. Genellikle test edilen düşük konsantrasyonlarda (0,25 ve 0,5 µg/ml) MN frekansında lineer bir artış görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise MN frekansı ya sabit kalmış veya azalma görülmüştür. Preparatların değerlendirilmesi sırasında nekroz ve apoptoza uğramış hücrelerin olduğu gözlemlenmiştir. Ancak çalışmada frekansları değerlendirilmemiştir. Fenech ve ark.

(1999b) hipotonik çözelti olarak KCl'ün kullanıldığı CBMN tekniğinde apoptoz veya nekroza uğramış hücre sitoplazmalarının KCl'den dolayı tahrip olacağını ve bu nedenle sayılmasının sağlıklı olamayacağını bildirmiştir. Bu çalışmada, incelenen preparatlarda gözlemlenen çoğu nekrotik ve apoptotik hücrenin sitoplazmalarının olmadığı görülmüş ve bundan dolayı değerlendirilmemişlerdir. Fenech ve ark. (1999b), fiziksel veya kimyasal bir ajan tarafından oluşturulan gözlemlenebilecek DNA hasarının bu ajanların neden olduğu nekrozis ve apoptozise bağlı olabileceğini bildirmiştir. Yine aynı çalışmada hücre bölünmesi gerektiren sitogenetik testlerde (CBMN ve KA gibi) bütün hasarlı hücrelerin gözlenmesinin zor olduğunu, hasarlı hücrelerin bir kısmının çekirdek bölünmesini tamamlamadan nekroz ve apoptozla uğradıklarını bildirmiştir. Bununla birlikte Decordier ve ark. (2002) MN'li hücrelerin elimine edildiğini bildirmiştir. Yaptıkları *in vitro* çalışma sonucunda MN oluşumunun apoptozun erken safhaları ile ilintili olabileceğini bildirmiştir. Yukarıda verilen literatür bilgileri doğrultusunda, pestisitlerin yüksek konsantrasyonlarının hücrede meydana getirdiği genetik hasarın tespit edilmesine olanak sağlanmadan hücrenin nekroz veya apoptozla elimine edildiğini düşündürmektedir.

Yüksek konsantrasyonlarında gözlemlenmeyen genetik hasarın bir diğer nedeni ise fungusitlerden kaynaklanan yüksek sitotoksosite olabileceği düşünülmektedir. Peiti ve ark. (1996) tarafından, organofosfor bir insektisit olan nuvacronun farklı konsantrasyonları ile Chinese Hamster ovary hücreleri (CHO) muamele edilmiştir. Nuvacronun düşük konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre önemli derecede MN oluşumuna neden olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarda ise MN frekansının azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada sitotoksosite de değerlendirilmiş ve nuvacronun yüksek konsantrasyonlarının aşırı derecede hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda elde edilen düşük MN frekansının aşırı hücre ölümüne bağlı olduğu bildirilmiştir. Barrat ve ark. (1985) toksisitenin ikincil bir mekanizma olarak DNA hasarı oluşturabileceğini bildirmiştir (Moretti ve ark., 2002). Bahsedilen çalışmada sitotoksik etkinin yüksek olduğu konsantrasyonlarda elde edilen düşük MN frekanslarının sitotoksiteden etkilenmiş olabileceği bildirilmiştir. Moretti ve ark. (2002) tarafından herbisit olan terbutrynin insan periferik lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksosite çalışmasında, artan konsantrasyonlarla birlikte MN ve KKD frekansında artış görülmüş ancak doza bağlı bir artış tespit edilmemiştir. Test edilen düşük konsantrasyonlar ile kıyaslandığında MN ve KKD değişiminin daha az olduğunu yüksek konsantrasyonların sebep olduğu sitotoksitenin bu durumdan sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, her iki muamele süresi dikkate alındığında fungusitler düşük MN

oluşumuna neden olmuşlardır. Yukarıdaki literatür bilgileri doğrultusunda bu durum fungusitlerin yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümlerine neden olması ile açıklanabilir.

Çalışmada değerlendirilen üç fungusittin MN oluşum verileri incelendiğinde her iki muamele sürelerinde birden fazla MN içeren BN hücrelerin olduğu görülmüştür. Bu durum her üç fungusittin insan periferik kan lenfositlerinde birden fazla kromozom kırığına ve/veya iç ipliklerinde hasara neden olması ile açıklanabilir.

Kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişimler olarak tanımlanan kromozomal kararsızlık, karsinogenezin sebepleri arasında görülmektedir (Jallepalli ve Lengauer, 2001). Bu kararsızlığın temel sebebi ve indikatörü olarak, kromozom ayrışmaları sırasında kromozomların zıt kutuplara çekilmesi sonucu meydana gelen anafaz köprüleridir. McClintock (1941), yaptığı çalışmada anafaz köprülerini DNA hasarının bir göstergesi olduğunu ilk defa bildirmiştir. Bu çalışmada, hasar görmüş kromozomların uç kısımlarının birleşmesi sonucu meydana gelen disentrik kromozomların zıt kutuplara çekilmesi sonucu meydana gelen yapı olarak tanımlanmıştır. DNA kırıkları sonucu meydana gelen köprülere ek olarak, telomerlerin aşırı kısalması sonucu (Hande, 1999; deLange, 2002) veya kalıcı kromatid kohezyonu sonucunda da anafaz köprülerinin meydana geldiği bildirilmiştir (Coelho, 2003; Haering, 2003).

NPB'ler DNA yanlış tamir ve/veya telomer uç birleşmelerinin bir biyomarkırı olarak kabul görmektedir. Fenech (2006) yaptığı çalışma sonucunda, farklı hasarları ortaya koyması bakımında önemli olduğunu ve bundan dolayı NPB'lerin CBMN tekniğinde güvenli bir şekilde değerlendirilebileceğini bildirmiştir. Tez çalışmasında, G₀ fazında bulunan lenfositlerin signumun çeşitli konsantrasyonları ile muamelesi sonucu elde edilen NPB frekansları çözücü kontrole göre yüksek olduğu görülmüştür. Doza bağlı bir artış olmamakla birlikte elde edilen frekansların istatistiksel olarak çözücü kontrolde elde edilen frekanslara göre anlamlı olmadığı saptanmıştır. Diğer taraftan, signum siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sayıda NPB oluşumuna neden olmuştur. Signumun 1, 1,5, 2 ve 3 µg/ml konsantrasyonları çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı NPB oluşumunu indüklemiştir. Sayısal olarak karşılaştırıldığında, siklusta ilerleyen lenfositler ile muamele edilen en yüksek konsantrasyon 6 µg/ml olmasına rağmen NPB frekansları G₀ fazı için elde edilen frekanslardan daha fazla bulunmuştur.

Boscalidin bazı konsantrasyonları G₀ fazı lenfositlerinde NPB oluşumunu indüklemiştir. Ancak 0,25 µg/ml konsantrasyonda NPB oluşumu gözlemlenmemiştir. Ayrıca 8 ve 75 µg/ml konsantrasyonlarda çözücü kontrolün oluşturduğu NPB frekansına eşit NPB frekansı elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar göz önüne alındığında boscalidin

G₀ fazı lenfositlerinde NPB oluşturmadığı söylenebilir. Diğer taraftan, siklusta ilerleyen lenfositler boscalidin çeşitli konsantrasyonları ile muamele edildiğinde NPB oluşumuna neden olmuş ancak konsantrasyona bağlı bir artış tespit edilmemiştir. 1 µg/ml boscalidin neden olduğu NPB oluşumu çözücü kontrol düzeyinde olmuştur. Siklusta ilerleyen lenfositlerde %50-60 sitotoksosite oluşturan konsantrasyon düşük olmasına rağmen oluşan NPB frekansları G₀ fazı lenfositlerinde daha fazladır. Genel olarak, boscalidin siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla NPB oluşumuna neden olduğu söylenebilir.

Pyraclostrobinin farklı konsantrasyonları G₀ fazı lenfositlerde NPB oluşumuna neden olmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak NPB artışı görülmemiştir. Pyraclostrobinin 0,25 µg/ml konsantrasyonu kültür ortamında çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Diğer konsantrasyonlar çözücü kontrole göre daha fazla NPB oluşumuna neden olmuş ancak bu anlamlı bir artış olmamıştır.

Diğer taraftan, pyraclostrobin siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla NPB oluşumuna neden olmuştur. Artan konsantrasyona bağlı olarak NPB frekansı artmıştır. Siklusta ilerleyen lenfositler için değerlendirilen en yüksek konsantrasyonun düşük olmasına rağmen daha fazla sayıda NPB oluşmuştur. Pyraclostrobinin 0,75 µg/ml konsantrasyonlarının oluşturduğu NPB frekansı istatistiksel olarak çözücü kontrole göre anlamlı bulunmuştur. Her iki muamele süresi düşünüldüğünde pyraclostrobinin siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sayıda NPB oluşumuna neden olduğu görülmüştür.

CBMN tekniğinde bu biyomarkırın yeni olması nedeniyle *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda yapılan birçok çalışmada değerlendirilmediği görülmektedir. Bununla birlikte signum, boscalid ve pyraclostrobinin test maddesi olarak değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mladinic ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada glyphosate, terbuthylazine ve carbofuran pestisitlerinin genotoksik aktiviteleri CBMN tekniği ile belirlenmiş, MN'nin yanında NPB ve NBUD oluşum frekansları da belirlenmiştir. Glyphosate ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde metabolik aktivasyon sisteminin varlığı ve yokluğunda doza bağlı olarak NPB frekansında artış görülmüştür. Bununla birlikte terbuthylazinenin farklı konsantrasyonlarının NPB frekansını arttırmadığı, carbofuranın ise metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda NPB frekansını doza bağlı olarak arttırdığı bulunmuştur. Yine başka bir çalışmada Garaj-Vrhovac ve ark. (2008), 25 µg/L *p,p'*-DDT pestisitinin insan periferik lenfositleri ile 24 ve 48 saat muamele edilmesi sonucunda çözücü kontrole göre NPB frekansında önemli derecede artışa neden olduğunu bildirilmiştir.

Çalışmada değerlendirilen 3 fungusit ve hücre bölünmesinin iki farklı evresi göz önüne alındığında signum ve pyraclostrobinin siklusta ilerleyen lenfositlerde açık bir şekilde NPB oluşumunu indüklediği görülmektedir. Bunlar dışında kalan fungusitler ve muamele şekillerinde bazı konsantrasyonlarda çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olmasına rağmen meydana gelen artışlar signum ve pyraclostrobininki kadar olmamıştır.

Thomas ve ark. (2003) tarafından yapılan bir araştırma sonucunda, NPB frekansı/MN frekansı oranının bir toksik ajanı karakterize etmek için önemli bir ipucu olduğunu tespit etmişlerdir. CBMN tekniğinde bir ajanın aneujenik özellik taşıması durumunda bu oranın 0 veya 0'a yakın olması gerektiği bildirilmiştir. Thomas ve ark. (2003), kendi çalışmalarında radyasyon gibi etkili bir klastojenik ajanın sebep olduğu NPB frekansı/MN frekansı oranının 0,77 olduğunu bildirmiştir. Dolayısı ile Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği ile CBMN tekniğini bir arada kullanmadan toksik ajanlar hakkında bilgi edinilebilmektedir. Mladinic ve ark. (2009) glyphosate, terbuthylazine ve carbofuran pestisitlerinin, Crespo-López ve ark. (2007) ise metil merkürünün aneujenik ve/veya klastojenik özellikleri NPB frekansı/MN frekansı oranını kullanarak ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada NPB frekansı/MN frekansı oranları test edilen bütün konsantrasyonlar dikkate alınarak hesaplanmıştır. Bunun yanında NPB ile MN frekansları arasında korelasyonlar hesaplanarak elde edilen eğrilerin eğimleri belirlenmiştir (Çizelge 23). Buna göre G₀ fazı lenfositlerin signum ile muamelesi ile siklusta ilerleyen lenfositlerin boscalid ile muamelesi sonucun NPB ve MN arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır. Elde edilen eğimler ve NPB/MN oranı aralıkları dikkate alındığında boscalidin her iki muamele şeklinde aneujenik etki gösterdiği söylenebilir. Diğer taraftan signum ve pyraclostrobinin G₀ fazı lenfositlerindeki etkilerinin başlıca aneujenik etki olduğu görülmektedir. Bununla birlikte signum ve pyraclostrobinin siklusta ilerleyen lenfositlerde ise klastojenik etki gösterdiğini sonucu çıkmaktadır. Bu sonuçlara göre signum ve pyraclostrobin, Thomas ve ark (2003) tarafından ileri sürülen görüş dikkate alındığında hücre siklusunun farklı fazlarında farklı etkiler gösterdiği görülmüştür. Djordjevic (1968), memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda bazı kimyasalların hücre siklusunun değişik fazlarında farklı tepkileri gösterdiğini bildirmiştir. Bu durumunun farklı sebepleri olabileceğini ileri sürülmüş; farklı fazlardaki hücrelerin test edilen kimyasala karşı permeabilitesinin farklı olabileceğini ayrıca kromozom yapısındaki DNA'ya ulaşılabilirliğinin hücre siklusunun farklı fazlarında

farklı olabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte hücrenin kimyasal ile muamele edilmesinden sonra DNA tamir işlemlerinin farklılık göstereceğini ifade etmiştir.

Çizelge 23. Signum, boscalid ve pyraclostrobinin lenfositlerde oluşturduğu MN ve NPB frekansları arasında elde edilen korelasyon katsayıları ve NPB/MN oranları.

Muamele	Fungusit	R ² NPB/MN	p	Eğim	NPB/MN Aralığı
G ₀ fazı lenfositleri	Signum	Korelasyon yok	-	-	0,05-0,28
	Boscalid	0,46	p<0,05	0,110	0,00-0,12
	Pyraclostrobin	0,52	p<0,05	0,199	0,14-0,31
Siklusta ilerleyen lenfositler	Signum	0,61	p<0,05	0,589	0,64-1,32
	Boscalid	Korelasyon yok	-	-	0,02-0,28
	Pyraclostrobin	0,97	p<0,05	1,178	1,06-1,25

NBUD, NPB ile birlikte CBMN tekniğinde önerilen ve son yıllarda geliştirilen bir biyomarkırdır. NBUD'lar morfolojik olarak MN ile aynı özellikleri taşımakta ancak nükleusa ince veya kalın bir sap ile bağlanması bakımından farklılık göstermektedir (Fenech, 2002). İnsan tümör hücreleri ile yapılan çalışmalarda NBUD'ların hücre siklusu S fazındaki amplifiye edilmiş kromozomlardan veya "double minutelardan" meydana geldiğini gösterilmiştir (Shimizu ve ark., 2000).

G₀ fazı lenfositleri üzerinde denenen signumun test edilen konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre NBUD artışına neden olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde signum, siklusta ilerleyen lenfositlerde de NBUD artışına neden olmuştur. Ancak test edilen hiçbir konsantrasyonun çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Her iki muamele süresi karşılaştırıldığında, siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sayıda NBUD oluştuğu görülmektedir.

Boscalidin test edilen bütün konsantrasyonları, G₀ fazı lenfositlerinde NBUD oluşumunu indüklemiştir. Oluşan NBUD frekansları çözücü kontrole göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde boscalid siklusta ilerleyen lenfositlerde NBUD oluşumuna neden olmuştur. Ancak meydana gelen artışlar doza bağlı olmamakla birlikte çözücü kontrol ile de istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır.

Her iki muamele evresi kıyaslandığında NBUD oluşumu bakımından bir fark olmadığı görülmüştür.

Pyraclostrobin G₀ fazı lenfositlerinde NBUD oluşumunu indüklemiştir. Ancak test edilen bütün konsantrasyonların oluşturduğu NBUD frekansları çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte konsantrasyon artışı ile birlikte NBUD frekansında artış meydana gelmemiştir. Pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde konsantrasyona bağlı olarak NBUD frekansında artış meydana gelmiştir. Test edilen en yüksek konsantrasyonda (0,75 µg/ml) oluşan NBUD frekansının çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada genotoksik aktivitesi araştırılan 3 fungusittin NBUD oluşturma özellikleri ilgili literatür bilgisine rastlanmamıştır. Pestisitlerin insan periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu NBUD oluşumu ile ilgili literatür sayısının çok az olduğu görülmüştür. Zeljezic ve Garaj-Vrhovac (2004) tarafından yapılan çalışmada, 2,4-dichlorophenoxyacetic asit herbisitinin ticari formu olan deherba A'nın insan periferel kan lenfositlerinde oluşturduğu genotoksitesini araştırılmıştır. Bu çalışmada, CBMN tekniği kullanılmış ve deherba A'nın test edilen iki konsantrasyonunun (0,4 ve 4 µg/ml) çözücü kontrole göre önemli derecede NBUD artışına sebep olduğu bulunmuştur. Garaj-Vrhovac ve ark. (2008) tarafından insan periferel kan lenfositleri ile farklı sürelerde muamele edilen *p,p'*-DDT pestisitinin 25 µg/L konsantrasyonunun çözücü kontrole göre anlamlı NBUD frekansında artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Mladinic ve ark. (2009), glyphosatenin *in vitro* lenfosit kültüründe metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda doza bağlı olarak NBUD artışına neden olduğunu, terbuthylazinenin lenfositlerde NBUD artışına neden olduğu ancak bunun anlamlı olmadığını, carbofuranın bir konsantrasyon dışında dozla birlikte NBUD frekansında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma pestisitlere maruz kalan çiftçiler arasında non-Hodgkin's lymphomalı hasta sayısının 2-8 kat arttığı bulunmuştur (Zeljezic ve Garaj-Vrhovac, 2004). non-Hodgkin's lymphomalı hasta lenfositleri ile yapılan çalışmalarda sıklıkla gen amplifikasyon bölgelerinin olduğu bildirilmiştir (Itoyama, 2002; Martinez-Climent, 2003; Sanchez-Izquierdo, 2003).

NBUD oluşumu ile ilgili ileri sürülen gen amplifikasyonu (Lindberg ve ark., 2007), genlerin hiperaktivasyonu (Prody ve ark, 1989), ve anasomi kurtarma mekanizması (Wang ve ark., 2004) gibi teorilerin 72 saat süren kültürlerde oluşan NBUD'ların oluşumu açıklayamayacağını, bu kültür süresinin kısa olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Gisselsson ve ark. (2000), NBUD'ların hücrede oluşan NPB'lerin iki farklı yerinde

kırılmasından sonra ana nukleuslarda kalan parçaların NBUD'ları oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, nukleus bölünmesi sonucu sitoplazmada kalan veya nukleus tarafından uzaklaştırılmış DNA parçalarının nukleer membran tarafından yakalanması sonucu NBUD'ların oluşabileceği ifade edilmiştir (Lindberg ve ark., 2007). Tez çalışmasında NBUD frekansı, sadece pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca NBUD ve NPB ($R=0,97$, $p<0,05$) ile NBUD ve BNMN ($R=0,99$, $p<0,05$) arasında bulunan yüksek ve anlamlı korelasyonlar, bu muamele şeklinde oluşan NBUD'ların Gisselsson ve ark. (2000) ve Lindberg ve ark. (2007) tarafından önerilen teorilerle açıklanabileceğini göstermektedir.

Her iki muamele evresi için CBPI değerleri dikkate alındığında önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. G_0 fazı lenfositlerinin signumun yüksek konsantrasyonlarında bölünebilme yeteneklerini sürdürdükleri halde, siklusta ilerleyen lenfositlerde bu özelliklerinin kaybolduğu görülmektedir. G_0 fazı lenfositleri ile muamelede signumun 75 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu çözücü kontrole göre %50-60 arasında sitotoksosite oluştururken, siklusta ilerleyen lenfositlerde bu değer 6 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu farklılık G_0 fazında bulunan lenfositlerin siklusta ilerleyen lenfositlere göre signuma karşı daha dirençli olduklarını göstermektedir. Signumun 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'den büyük konsantrasyonlarında elde edilen CBPI değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde çözücü kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte signumun test edilen bütün konsantrasyonları, siklusta ilerleyen lenfositlerde çözücü kontrole göre CBPI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmaya neden olmuştur.

Boscalidin %50-60 arasında sitotoksosite oluşturan konsantrasyonları G_0 fazında bulunan ve siklusta ilerleyen lenfositlerde sıra ile 75 ve 6 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Daha yüksek konsantrasyonlarda yeterli sayıda BN hücre elde edilememiştir. 75 $\mu\text{g/ml}$ boscalid G_0 fazında bulunan lenfositlerde çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede CBPI değerinde azalmaya neden olmuştur. Ancak siklusta ilerleyen lenfositler ile test edilen boscalidin 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 'den büyük konsantrasyonlarının çözücü kontrole göre istatistiksel olarak CBPI değerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen veriler, boscalidin hücre bölünmesi üzerine olan etkisi bakımında signum ile benzer özellikler gösterdiği söylenebilir. G_0 fazında bulunan lenfositlerin siklusta ilerleyen lenfositlere kıyasla hücre bölünmesi bakımından daha dirençli oldukları görülmektedir.

Pyraclostrobinin test edilen bütün konsantrasyonları G_0 fazında bulunan lenfositlerde çözücü kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde CBPI'inde azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan pyraclostrobinin test edilen 2 konsantrasyonu siklusta ilerleyen

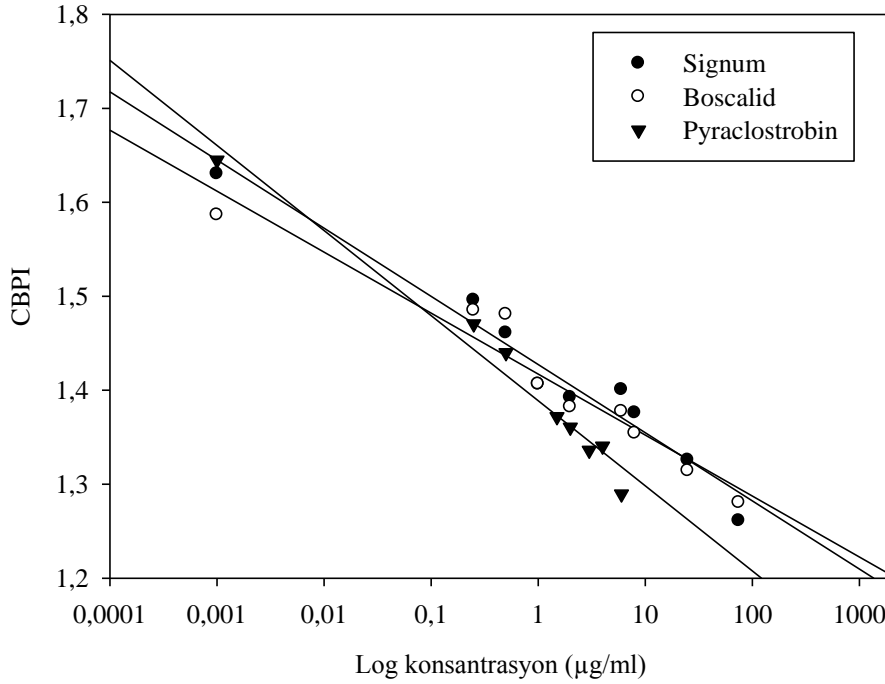
lenfositlerde anlamlı CBPI azalmasına neden olmuştur. Her iki muamele süresi dikkate alındığında, G₀ fazında bulunan lenfositlerin pyraclostrobine karşı daha dirençli oldukları söylenebilir. Signum ve boscalid ile kıyaslandığında pyraclostrobin daha sitotoksik olduğu ortaya çıkmaktadır. Pyraclostrobinin çok düşük konsantrasyonları özellikle siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir.

Signum, boscalid ve pyraclostrobinin *in vitro* veya *in vivo* koşullarda meydana getirdiği sitotoksosite ile ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Daniel ve ark. (2007) soya fasulyesindeki mantar hastalığı için Amerika'da yaygın olarak 4 farklı fungusitin kullanıldığını ve bunlardan 2 tanesinin strobilurin sınıfına ait olduğunu bildirmişlerdir. Bahsedilen fungusitlerin her geçen gün tarımda kullanımlarının arttığı, ancak bu bileşiklerin toksisite ve insan sağlığına olan etkileri ile ilgili az bilgi olduğu ifade edilmiştir. Yaptıkları çalışmada pyraclostrobin ile aynı sınıfta yer alan trifloxystrobin ile birlikte tetraconazole, propiconazole, tebuconazole ve myclobutanilin CHO hücreleri üzerine oluşturdukları sitotoksosite mikropate yöntemi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirilen beş fungusitin önemli derecede sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca CHO hücre yoğunluğunu %50 oranında azaltan en düşük konsantrasyonun strobilurin sınıfında yer alan trifloxystrobine ait olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte trifloxystrobin farklı sınıflara ait 15 farklı fungusit ile karşılaştırılmış ve CHO hücre yoğunluğunu %50 oranında azaltması bakımından en sitotoksik fungusit olarak tanımlanmıştır. Genel olarak strobilurinler mitokondrial solunumu inhibe ederek ATP sentezinde kayba neden olmaktadır. Daniel ve ark. (2007) trifloxystrobinin memeli hücrelerinde meydana getirdiği yüksek sitotoksitenin nedeninin farklı olabileceğini bildirmişlerdir. Tez çalışmasında değerlendirilen ve trifloxystrobin ile aynı sınıfta yer alan pyraclostrobin insan periferal lenfositlerinde düşük konsantrasyonda yüksek sitotoksosite oluşturmuştur. Elde edilen bu sonuçlar CHO hücrelerinde elde edilen sitotoksosite ile uyum içinde olup mekanizması ile ilgili çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

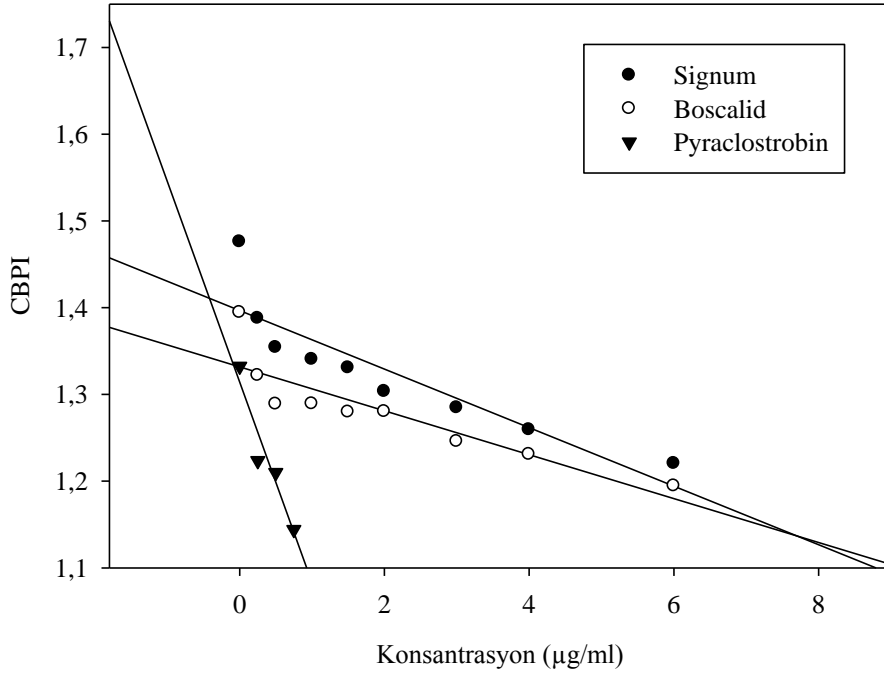
Tronov ve ark. (2006) N-methyl-N Nitrosoure ile muamele edilen G₀ fazında bulunan ve siklusta ilerleyen lenfositlerde insan periferal lenfositleride oluşan sitotoksiteler karşılaştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre G₀ fazında bulunan lenfositlerin N-methyl-N Nitrosourenin sitotoksik aktivitesine karşı daha dirençli olduklarını göstermiştir. Laffon ve ark. (2001) yaptıkları *in vitro* genotoksosite ve sitotoksosite çalışmasında, styrene-7,8-oxidenin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak CBPI değerinin istatistiksel olarak azaldığını bildirmiştir. Bu azalmanın, yeni bir DNA sentezi başlamadan

önce meydana gelen genotoksik hasarların tamir sistemleri tarafından tamir edilmesine izin veren hücre siklusundaki gecikmeyi gösterdiğini ifade etmiştir.

Bu çalışmada değerlendirilen her üç fungusittin insan periferal kan lenfositlerinde oluşturdukları sitotoksik etkiler göz önüne alındığında, signum ile boscalidin benzer etki tarzına sahip oldukları görülmektedir. Signum ve boscalidin aynı konsantrasyonları, G_0 fazında ve siklusta ilerleyen lenfositlerde benzer sitotoksikite oluşturmuşlardır (Şekil 44, 45). Ancak pyraclostrobinin signum ve boscalidin aksine lenfositlerde farklı özellikte etki göstermiştir. Hem G_0 fazında hem de siklusta ilerleyen lenfositlerde düşük konsantrasyonlarda benzer sitotoksikite oluşturmuştur. Dolayısı ile signumun aktif maddesi olan pyraclostrobinin insan periferal kan lenfositleri üzerine boscalide göre daha sitotoksik olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 44. Signum, boscalid ve pyraclostrobin ile muamele edilen G_0 fazı lenfositlerinde elde edilen CBPI değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 45. Signum, boscalid ve pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde elde edilen CBPI değerlerinin karşılaştırılması

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, ticari olarak satılan signum ile aktif maddelerinin (boscalid ve pyraclostrobin) G_0 ve siklusta ilerleyen insan periferal kan lenfositleri ile muamelesinde test edilen konsantrasyonların çözücü kontrole göre daha fazla MN oluşumuna yol açtığı görülmüştür. Her üç fungusit ve iki uygulama şekli dikkate alındığında test edilen bazı konsantrasyonlarda elde edilen MN frekansların istatistiksel olarak çözücü kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Her bir konsantrasyonun neden olduğu MN frekansı dikkate alındığında doza bağlı bir artış görülmemiştir. Pyraclostrobin ile muamele edilen G_0 fazı lenfositlerinde meydana gelen MN oluşumu, signum ve boscalid ile benzer özellik göstermiştir. Ancak pyraclostrobinin siklusta ilerleyen lenfositler ile muamelesinde, konsantrasyon artışına bağlı MN oluşumu görülmüştür.

Signum ve boscalidin test edilen tüm konsantrasyonları, G_0 fazı lenfositlerinde istatistiksel olarak anlamlı NPB oluşumuna neden olmamışlardır. Pyraclostrobinin tek bir konsantrasyonu, G_0 fazı lenfositlerinde anlamlı NPB oluşuma neden olmuş ancak test edilen konsantrasyonlar dikkate alındığında konsantrasyona bağlı bir artış görülmemiştir. Diğer taraftan boscalid, siklusta ilerleyen lenfositlerde NPB oluşumuna neden olmazken, signum ve pyraclostrobinin bazı konsantrasyonları çözücü kontrole göre anlamlı NPB oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Ayrıca pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde meydana gelen NPB oluşumunun konsantrasyon artışına bağlı olduğu görülmüştür.

Bir biyomarkır olarak NBUD oluşumu göz önüne alındığında, pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositler dışındaki muamele şeklinde herhangi bir artış görülmemiştir. Diğer taraftan pyraclostrobin siklusta ilerleyen lenfositlerde doza bağlı NBUD oluşumuna neden olmuştur.

Signum ve boscalid her iki muamele evresinde benzer sitotoksik özellik göstermiştir. Her iki fungusit, G_0 fazı lenfositleri ile karşılaştırıldığında siklusta ilerleyen lenfositlerde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Siklusta ilerleyen lenfositlerde %50-60 sitotoksiste daha düşük konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Diğer taraftan pyraclostrobin, her iki muamele şekli dikkate alındığında %50-60 sitotoksiste daha düşük konsantrasyonlarda oluşturmuştur. Özellikle pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde çok daha düşük konsantrasyon ile %50-60 sitotoksiste elde edilmiştir. Signum, boscalid ve pyraclostrobin ile her iki muamele süresi dikkate alındığında pyraclostrobinin en yüksek

sitotoksik özelliği gösterdiği, signum ile boscalidin daha düşük sitotoksosite ile benzer özellik gösterdikleri görülmüştür.

Genel olarak, signum, boscalid ve pyraclostrobinin insan periferik kan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda genotoksik ve sitotoksik oldukları söylenebilir. Bu üç fungusit ile ilgili olarak başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle farklı test sistemleri ve farklı hücreler kullanılarak, *in vitro* ve/veya *in vivo* koşullarda test edilmeleri gerekmektedir. Böylelikle test edilen üç fungusite ait genotoksik veriler daha da kesinlik kazanmış olacaktır.

Bu çalışmada, signum, boscalid ve pyraclostrobinin sadece genotoksik ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda her üç fungusitin önemli derecede MN oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Bilindiği üzere, MN'ler kromozom kırıklarından veya bütün bir kromozomdan meydana gelmektedirler. Dolayısı ile bu çalışmada bahsedilen üç fungusitin aneujenik ve/veya klastojenik olup olmadıkları araştırılmamışlardır. Bundan sonraki çalışmalarda, CBMN tekniği ile FISH tekniği birleştirilerek bu üç fungusit için aneujenik ve klastojenik özellikleri araştırılmalıdır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, son yıllarda kullanımı artan signumun özellikle tarımda doğrudan uygulayan veya uygulandığı alanda çalışan bireylerde maruziyetten dolayı oluşabilecek genetik riskin tahmin edilmesinde yararlı olacaktır.

Sonuç olarak *in vitro* şartlarda belirli konsantrasyonlarda genotoksik ve sitotoksik olduğu görülen signumun *in vitro* şartlardaki etkileri ve davranışları incelenmeli, tarımda uygulayıcıların sağlığı üzerine etkilerinin uygulamadan sonra tarım ürünlerindeki kalıcılığını araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aardema M.J., Snyder R.D., Spicer C., Divi K., Morita T., Mauthe R.J., Gibson D.P., Soelter S., Curry P.T., Thybaud V., Lorenzon G., Marzin D. ve Lorge E., 2006. SFTG International Collaborative Study on the *In Vitro* Micronucleus Test. III. Using CHO Cells. *Mutation Res.*, 607: 61-87.
- Abell A., Juul S. ve Bonde J.P., 2000. Time to Pregnancy among Female Greenhouse Workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, 26: 131–136.
- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R., Waters M.D. ve Aitio A., 2000. IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans, International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.*, 463: 111–172.
- Albertini S. ve Miller B., 1997. Detailed Data on *In vitro* MNT and *In vitro* CA: Industrial Experience. *Mutat. Res.*, 392: 187-208.
- Anwar W.A., 1994. Assessment of Cytogenetic Changes in Human Populations at Risk in Egypt. *Mutat.Res.*, 313: 183-191.
- Balba H., 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 42: 441-451.
- Barrat R., Bradley M., Douglas G., Glauert H., Lakhanisky T., Martin C. ve Probst G., 1985. Summary report on the performance of assays for DNA damage. In: Ashby, J., De Serres, F.L., et al.(Eds.), *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 59–67.
- Bartholomaeus A., 2003. Pesticide residues in food-2003-Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, Pyraclostrobin. Retrieved May 07, 2010, from http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166519X_pyraclostrobin.pdf
- BASF., 2009. Retrieved May 07, 2010, from http://www.agricentre.basf.co.uk/uk/deploy/media/uk_ie_internet/product_files_uk/labels/Signum.pdf.
- Benner S.H., M.Lippman S. ve Wargovich M.J., 1994. Micronuclei a Biomarker for Chemoprevention Trials: Results of a randomized Study in Oral Pre-Malignancy. *Int.J.Cancer.*, 457–459.
- Bolognesi C., 2003. Genotoxicity of Pesticides: A Review of Human Biomonitoring Studies. *Mutat. Res.* 543(3): 251-272.

- Bolognesi C., Bonatti S., Degan P., Gallerani E., Peluso M., Rabboni R., Roggieri P. ve Abbondandolo A., 1997. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (5): 1957–1962.
- Bonassi S., Ceppi H.N.M., Strömberg U., Vermeulen R. ve Znaor A., 2008. Chromosomal Aberration Frequency in Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer : Result From A Pooled Cohort Study of 22 358 Subjects in 11 Countries. *Carcinogenesis*, 29; 1178-1183.
- Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H. ve Fenech M., 2007. An increased micronucleus frequency in PBLs predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3): 625-631.
- Bony S., Gaillard I. ve Devaux A., 2010. Genotoxicity Assessment of Two Vineyard Pesticides in Zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90 (3 – 6): 421–428.
- Bony S., Gillet C., Bouchez A., Margoum C. ve Devaux A., 2008. Genotoxic Pressure of Vineyard Pesticides in Fish: Field and Mesocosm Surveys. *Aquatic Toxicology*, 89 (3): 197-203.
- Chauhan L.K.S., Kumar M.N., Paul B., Goel S.K. ve Gupta S.K., 2007. Cytogenetic Effects of Commercial Formulations of Deltamethrin and/or Isoproturon on Human Peripheral Lymphocytes and Mouse Bone Marrow Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48: 636-643.
- Cheng T., Christiani D.C., Xiping X., Wain J.C., Wiencke J.K. ve Kelsey K.T., 1996. Increased Micronucleus Frequency in Lymphocytes from Smokers with Lung Cancer. *Mutat.Res.*, 43–50.
- Coelho P.A., Queiroz-Machado J. ve Sunkel C.E., 2003. Condens Independent Localisation of Topoisomerase II to an Axial Chromosomal Structure is Required For Sister Chromatid Resolution During Mitosis. *J. Cell. Sci.*, 116: 4763–4776.
- Costa C., Silva S., Coelho P., Roma-Torres J., Teixeira J.P. ve Mayan O., 2007. Micronucleus Analysis in a Portuguese Population Exposed to Pesticides: Preliminary Survey. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.*, 210: 415–418.

- Costa C., Teixeira J.P., Silva S., Roma-Torres J., Coelho P., Gaspar J., Alves M., Laffon B., Rueff J. ve Mayan O., 2006. Cytogenetic and Molecular Biomonitoring of a Portuguese Population Exposed to Pesticides. *Mutagenesis*, 21(5): 343-350.
- Cowell J.K., 2001. *Molecular Genetics and Cancer*, 2nd Edn. Bios Scientific, Oxford, UK.
- Crespo-López M.E., de Sá A.L., Herculano A.M., Burbano R.R. ve Martins do Nascimento J.L., 2007. Methylmercury Genotoxicity: A Novel Effect in Human Cell Lines of the Central Nervous System. *Environment International*, 33: 141–146.
- Daniel S.L., Hartman G.L., Wagner E.D. ve Plewa M.J., 2007. Mammalian Cell Cytotoxicity Analysis of Soybean Rust Fungicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78 (6): 474-478.
- de Lange T., 2002. Protection of Mammalian Telomeres. *Oncogene*, 21: 532–540.
- Decordier I., Dillen L., Cundari E. ve Kirsch-Volders M., 2002. Elimination of Micronucleated Cells by Apoptosis after Treatment with Inhibitors of Microtubules. *Mutagenesis*, 17 (4): 337-344.
- Delen N., Durmuşoğlu E., Güncan A., Güngör N., Turgut C. ve Burçak A., 2005. Türkiye’de Pestisid Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara.
- Demsia G., Vlastos D. Goumenou M. ve 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.
- Denison R., 2009. *EPA’s New Chemicals Program: TSCA dealt EPA a very poor hand*. Retrieved May 07, 2010, from <http://blogs.edf.org/nanotechnology/2009/04/16/epas-new-chemicals-program-tsca-dealt-epa-a-very-poor-hand/>
- Djordjevic B. ve Kim J.H., 1968. Different Lethal Effects of Mitomycin. C And Actinomycin D during the Division Cycle of Hela Cells. *J. Cell Biol.*, 38 (3): 477–482.
- Duesberg P., Rasnick D., Li Ruhong L., Winters L., Rausch C. ve Hehlmann R., 1999. How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res.*, 19: 4887–4906.
- Duffaud F., Orsière T., Villani P., Pelissier A.L., Volot F., Favre R. ve Botta A., 1997. Comparison Between Micronucleated Lymphocyte Rates Observed in Healthy Subjects and Cancer Patients. *Mutagenesis*, 12(4): 227-31.

- Eastmond D.A. ve Tucker J.D., 1989. Identification of Aneuploidy-Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13: 34-43.
- ECVAM., 2006. *Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006.* Retrieved May 07, 2010, from <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- El-Zein R.A., Schabath M.B., Etzel C.J., Lopez M.S., Franklin J.D. ve Spitz M.R., 2006. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Res.*, 66(12): 6449-6456
- Engelhardt G. ve Hoffmann H.D., 1998. In vitro unscheduled DNA synthesis (UDS) assay with BAS 500 F in primary rat hepatocytes (Project No. 81M0308/964306). Unpublished report No. 98/11421 from BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, Ludwigshafen, Germany, 19 October 1998.
- Ennaceur S., Ridha D. ve Marcos R., 2008. Genotoxicity of the Organochlorine Pesticides 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and hexachlorobenzene (HCB) in Cultured Human Lymphocytes. *Chemosphere*, 71: 1335–1339.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2002. Pyraclostrobin; Pesticide Tolerance.
- ESAC., 2006. *ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review. Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test. Summary and Conclusions of the Peer Review Panel.* Retrieved May 07, 2010, from <http://ecvam.jrc.it/index.html>. factsheets/index.htm#A,2008.
- FAO (Food and Agricultural Organization), 2002. FAO/WHO Global Forum of Food Safety Regulators., Marrakech, Morocco.
- Fenech M. ve Morley A.A., 1985. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147: 29–36.
- Fenech M., 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutation Res.*, 392: 11-18.
- Fenech M., 2000. The in-Vitro Micronucleus Technique. *Mutat.Res.*, 455: 81–95.
- Fenech M., 2002. Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. *Drug Discov. Today.*, 7: 1128–1137.

- Fenech M., 2006. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Evolves into a “Cytome” Assay of Chromosomal Instability, Mitotic Dysfunction and Cell Death. *Mutat. Res.*, 600: 58-66.
- Fenech M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5): 1084-1104.
- Fenech M., Baghurst P., Luderer W., Turner J., Record S., Ceppi M. ve Bonassi S., 2005. Low Intake of Calcium, Folate, Nicotinic Acid, Vitamin E, Retinol, Beta-Carotene and High Intake of Pantothenic Acid, Biotin and Riboflavin are Significantly Associated with Increased Genome Instability Results from a Dietary Intake and Micronucleus Index Survey in South Australia. *Carcinogenesis*, 26: 991–999.
- Fenech M., Crott J., Turner J. ve Brown S., 1999b. Necrosis, Apoptosis, Cytostasis and DNA Damage in Human Lymphocytes Measured Simultaneously within the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay: Description of the Method and Results For Hydrogen Peroxide. *Mutagenesis*, 14 (6): 605-612.
- Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E. ve Bonassi S., 1999a. The Human Micronucleus Project—An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutat.Res.*, 428: 271–283.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (n.d.) Retrieved January 10, 2011, from <http://www.fao.org/docrep/006/Y5221E/y5221e0o.htm>
- Food Safety Commission Pesticides Expert Committee (FSC-PEC)., 2004. Evaluation Report Boscalid.
- Fucic A., Markovic D., Herceg Z., Gamulin M., Katic J., Stojkovic R., Ferencic Z., Mildner B., Jazbec A. ve Dobranic T. 2008. Developmental and Transplacental Genotoxicology: Fluconazole. *Mutat. Res.*, 657(1): 43-7.
- Garaj-Vrhovac V., Gajski G. ve Ravlić S., 2008. Efficacy of HUMN Criteria for Coring the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes Exposed to a Low Concentration of p,p'-DDT. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 41 (6): 473-476.
- Gisselsson D., Bjork J., Hoglund J.M., Mertens F., Dal Cin P., Akerman M. ve Mandahl N., 2001. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. *Am. J. Pathol.*, 158: 199–206.
- Guadano A., Gonzalez-Coloma A. ve Pena E., 1998. Genotoxicity of the Insecticide Rotenone in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 414: 1–7.

- Haering C.H. ve Nasmyth K., 2003. Building and Breaking Bridges between Sister Chromatids. *Bioassays*, 25: 1178–1191.
- Hagmar L., Bonassi S., Strömberg U., Mikoczy Z., Lando C., Hansteen I.L., Huici-Montagud A., Knudsen L., Norppa H., Reuterwall C., Tinnerberg H., Brøgger A., Forni A., Högstedt B., Lambert B., Mitelman F., Nordenson I., Salomaa S. ve Skerfving S., 1998. Cancer Predictive Value of Cytogenetic Markers Used in Occupational. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 405(2): 171-178.
- Hagmar L., Brogger A., Hansteen I.L., Heim S., Högstedt B., Knudsen L., Lambert B., Linnainmaa K., Mitelman F., Nordenson I., Reuterwall C., Salomaa S., Skerfving S. ve Sorsa M., 1994. Cancer Risk in Humans Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.* 54: 2919–2922.
- Hande M.P., Samper E., Lansdorp P. ve Blasco M.A., 1999. Telomere Length Dynamics and Chromosomal Instability in Cells Derived from Telomerase Null Mice. *J. Cell Biol.*, 144: 589–601.
- Hauke K., Creemers P., Brugmans W. ve Van Laer S., 2004. Signum, a New Fungicide with Interesting Properties in Resistance Management of Fungal Diseases in Strawberries. *Commun. Agric. App. Biol. Sci.*, 69(4): 743-755.
- Heddle J.A., 1990. Micronuclei in vivo. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 340B:185–194.
- Heddle J.A., Cimino M.C., Hayashi M., Romagna F., Shelby M.D., Tucker J.D., Vanparys P. ve MacGregor J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18:277–291.
- Ila H.B., Topaktas M., Rencuzogullari E., Kayraldiz A., Donbak L. ve Daglioglu Y.K., 2008. Genotoxic Potential of Cyfluthrin. *Mutat Res.*, 656(1-2): 49-54.
- International Atomic Energy Agency (IAEA), 2001. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment, A manual, Technical Reports Series No. 405
- Itoyama T., Nanjungud G., Chen W.Y., Dyomin V.G., Teruya-Feldstein J., Jhanwar S.C., Zelenetz A.D. ve Chaganti R.S.K., 2002. Molecular Cytogenetic Analysis of Genomic Instability at the 1q12-22 Chromosomal Site in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 35 (4): 318–328.
- Jallepalli P.V. ve Lengauer C., 2001. Chromosome Segregation and Cancer: Cutting Through the Mystery. *Nat. Rev. Cancer.*, 1: 109–117.

- Kersten B., Zhang J., Brendler Schwaab S.Y., Kasper P. ve Müller L., 1999. The Application of the Micronucleus Test in Chinese Hamster V79 Cells to Detect Drug-Induced Photogenotoxicity. *Mutation Res.*, 445: 55-71.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., Jr Lorge E., Norppa H., Surralles J., von der Hude W. ve Wakata A., 2000. Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 167-172.
- Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Fenech. M., Ishidate M., Jr Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surralles J., Vanhauwaert A. ve Wakata A., 2003. Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Mutation Res.*, 540: 153-163.
- Kolber M.A., Brosschat K.O., ve Landa-Gonzalez B., 1990. Cytochalasin-B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB J*, 4: 3021-3027.
- Laffon B., Pásaro E. ve Méndez J., 2001. Genotoxic Effects of Styrene-7,8-Oxide in Human White Blood Cells: Comet Assay in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Mutat. Res.*, 491:163–172.
- Leal-Garza C.H., Cerda-Flores R.M., Leal-Elizondo E. ve Cortes-Gutierrez E.I., 2002. Micronuclei in Cervicals Mearsand Peripheral Blood Lymphocytes from Women With and without Cervicaluterine Cancer. *Mutat.Res.*, 57–62.
- Lindberg H.K., Wang X., Järventus H., Falck G.C.M., Norppa H. ve Fenech M., 2007. Origin of Nuclear Buds and Micronuclei in Normal and Folate-Deprived Human Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 617: 33–45.
- Lorge E., Hayashi M., Albertini S. ve Kirkland D., 2007. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test I. Theoretical aspects. *Mutat. Res.*, 655 (1-2): 1-3.
- Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G. ve Marzin D., 2006. SFTG International Collaborative Study on *In Vitro* Micronucleus Test. I. General Conditions of the Study. *Mutat. Res.*, 607: 13-36.
- Ma C., Martin S., Trask B. ve Hamlin J.L., 1993. Sister Chromatid Fusion Initiates Amplification of the Dihydrofolate Reductase Gene in Chinese Hamster Cells. *Genes. Dev.*, 7: 605–620.
- Martinez-Climent J.A., Sanchez-Izquierdo D., Sarsotti E., Blesa D., Benet I., Climent J., Vizcarra E., Marugan I., Terol M.J., Sole F., Cigudosa J.C., Siebert R., Dyer M.J.S. ve Garcia-Conde J., 2003. Genomic Abnormalities Acquired in the Blastoc

- Transformation of Splenic Marginal Zone B-Cell Lymphoma. *Leuk. Lymphoma.*, 44 (3): 459–464.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I. ve Kirsch-Volders M., 2006. Chromosomal Changes: Induction, Detection Methods and Applicability in Human Biomonitoring. *Biochimie.*, 88: 1515–1531.
- McClintock B., 1941. Spontaneous Alterations in Chromosome Size and Form in *Zea Mays*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 9: 72–81.
- Mladinic M., Perkovic P. ve Zeljezic D., 2009. Characterization of Chromatin Instabilities Induced by Glyphosate, Terbutylazine and Carbofuran Using Cytome FISH Assay. *Toxicology Letters*, 189: 130–137.
- Moretti M., Marcarelli M., Villarini M., Fatigoni C., Scassellati-Sforzolini G. ve Pasquini R., 2002. In Vitro Testing for Genotoxicity of the Herbicide Terbutryn: Cytogenetic and Primary DNA Damage. *Toxicology in Vitro*, 16: 81–88.
- Muller-Tegethoff K., Kersten B., Kasper P. ve Muller L., 1997. Application of the in vitro rat hepatocyte micronucleus assay in genetic toxicology testing. *Mutat. Res.*, 392:125–138.
- Muranlı F.D.G. ve Kaymak F., 2004. The Cytogenetic Effects of Logran on Human Lymphocyte Culture. *Cytologia*, 69 (4): 467-473.
- Murgia E., Ballardini M., Bonassi S., Rossi A.M. ve Barale R., 2008. Validation of Micronuclei Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes as Early Cancer Risk Biomarker in a Nested Case-Control Study. *Mutat. Res.*, 639(1-2): 27-34.
- Natarajan A.T. ve Obe G., 1982. Mutagenicity Testing with Cultured Mammalian Cells: Cytogenetic Assays. in: Heddle J.A., Eds., *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic Press, New York. 171–213.
- Natarajan A.T., 2002. Chromosome Aberrations: Past, Present and Future. *Mutat.Res.*, 504: 3-16.
- Nesime Y., Lokman B., Mehmet A.İ., Cantürk G., Başar Ç. ve Mustafa K., 2004. Acute Pesticides Poisoning Related Deaths in Turkey. *Vet. Hum. Toxicol.*, 46 (6): 342-344.
- Norppa H. ve Falck G.C., 2003. What do human micronuclei contain?. *Mutagenesis*, 18: 221–233.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2007. OECD Guideline for the Testing of Chemicals Draft Proposal for a New Guideline 487: In-Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNVT).

- Oliver J., Meunier J.R., Awogi T., Elhajouji A., Ouldelhkim M.C., Bichet N., Thybaud V., Lorenzon G., Marzin D. ve Lorge E., 2006. SFTG International Collaborative Study on the *In Vitro* Micronucleus Test. V. Using L5178Y cells. *Mutation Res.*, 607: 125-152.
- Parry E.M., Parry J.M., Corso C., Doherty A., Haddad F., Hermine T.F., Johnson G., Kayani M., Quick E., Warr T. ve Williamson J., 2002. Detection and Characterization of Mechanisms of Action of Aneugenic Chemicals. *Mutagenesis*, 17 (6): 509–521.
- Pastor S., Creus A., Parrón T., Cebulska-Wasilewska A., Siffel C., Piperakis S. ve Marcos R., 2003. Biomonitoring of Four European Populations Occupationally Exposed to Pesticides: Use of Micronuclei as Biomarkers. *Mutagenesis*, 18 (3): 249-258.
- Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S. ve Marcos R., 2001. Cytogenetic Analysis of Greek Farmers Using the Micronucleus Assay in Peripheral Lymphocytes and Buccal Cells. *Mutagenesis*, 16 (6): 539-545.
- Pastor S., Lucero L., Gutierrez S., Durban R., Gomez C., Parron T., Creus A. ve Marcos R., 2002. A follow-up Study on Micronucleus Frequency in Spanish Agricultural Workers Exposed to Pesticides. *Mutagenesis*, 17(1): 79-82.
- Peiti P., Sakamoto-Hojo E.T. ve Syllos Colus I.M., 1996. Genotoxic Activity of the Insecticide Nuvacron (Monocrotophos) Detected by the Micronucleus Test in Bone Marrow Erythrocytes of Mice and In CHO Cells. *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (4): 571-576.
- Pimentel D., 1995. Amounts of Pesticides Reaching Target Pests: Environmental Impacts and Ethics. *J. Agric. Environ. Ethic.*, 8:17–29.
- Prody C., Dreyfus P., Zamir R., Zakut H. ve Soreq H., 1989. Denovo Amplification within a ‘Silent’ Human Cholinesterase Gene in a Family Subjected to Prolonged Exposure to Organophosphorous Insecticides. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 690–694.
- Rencüzoğulları R., Basri İla H., Kayraldız A., Arslan M., Budak Diler S. ve Topaktaş M., 2004. The Genotoxic Effect of the New Acaricide Etoxazole. *Russian Journal of Genetics*, 40(11):1300–1304. *From Genetika*, 40(11): 1571–1575.
- Ribas G., Surrallés J., Carbonell E., Xamena N., Creus A. ve Marcos R., 1997/98. Genotoxic Evaluation of the Herbicide Paraquat in Cultured Human Lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 17: 339–347.

- Rosin M.P. ve German J., 1985. Evidence for Chromosome Instability *in Vivo* in Bloom Syndrome: Increased Numbers of Micronuclei in Exfoliated Cells. *Hum.Genet.*, 187–191.
- Rudolph K.L., Millard M., Bosenberg M.W. ve DePinho R.A., 2001. Telomere Dysfunction and Evolution of Intestinal Carcinoma in Mice and Humans. *Nat. Genet.*, 28 (2) :155–159.
- Russo A. ve Levis A.G., 1991. The contribution of the mouse spermatid micronucleus assay to the detection of germinal mutagens. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 372:513–520.
- Sanchez-Izquierdo D., Buchonnet G., Siebert R., Gascoyne R.D., Climent J., Karran L., Marin M., Blesa D., Horsman D., Rosenwald A., Staudt L.M., Albertson D.G., Du M.Q., Ye H.T., Marynen P., Garcia-Conde J., Pinkel D., Dyer M.J.S. ve Martinez-Climent J.A., 2003. MALT1 is Deregulated by both Chromosomal Translocation and Amplification in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Blood*, 101 (11): 4539–4546.
- Sankararamakrishnan N., Sharma A.K. ve Sanghi R., 2005. Organochlorine and Organophosphorous Pesticide Residues in Ground Water and Surface Waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India. *Environ. Int.*, 31: 113–20.
- Scassellati-Sforzolini G., Pasquini R., Moretti M., Villarini M., Fatigoni C., Dolara P., Monarca S., Caderni G., Kuchenmeister F., Schmezer P. ve Pool-Zobel B.L., 1997. In Vivo Studies on Genotoxicity of Pure and Commercial Linuron. *Mutat. Res.*, 390 (3): 207-221.
- Schmid W., 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis, in: A. Hollaender (Ed.), Chemical Mutagens, principles and methods for their detection., Vol. 4, Plenum Press, New York, 1976, 31–53.
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H. ve Wahl G.M., 1998. Selective Entrapment of Extra chromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation During S Phase. *J. Cell. Biol.*, 140: 1307–1320.
- Shimizu N., Shimura T. ve Tanaka T., 2000. Selective Elimination of Acentric Double Minutes from Cancer Cells through the Extrusion of MNi. *Mutat. Res.*. 448: 81–90.
- Shimura M., Onozuka Y., Yamaguchi T., Hatake K., Takaku F. ve Ishizaka Y., 1999. MNi Formation with Chromosome Breaks and Gene Amplification Caused By *Vpr*, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus. *Cancer Res.*, 59: 2259–2264.

- Siviková K. ve Dianovský J., 1999b. Genotoxic Activity of the Commercial Herbicide Containing Bifenox in Bovine Peripheral Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 439 (2): 129-35.
- Sivikova K. ve Diyanovsky J., 1999a. Chromosome Damage in Cultured Bovine Peripheral Lymphocytes Induced by Herbicide Chloridazon. *Acta. Vet. Brno.*, 68: 105-110.
- Smith A.H., Hopenhayn-Rich C., Warner M., Biggs M.L., Moore L. ve Smith M.T., 1993. Rationale for selecting exfoliated bladder cell micronuclei as potential biomarkers for arsenic genotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 40:223–234.
- Soloneski S., González M., Piaggio E., Apezteguiza M., Reigosa M.A. ve Larramendy M.L., 2001. Effect of Dithiocarbamate Pesticide Zineb and Its Commercial Formulation Azzurro. Genotoxic Evaluation on Cultured Human Lymphocytes Exposed In Vitro. *Mutagenesis*, 16: 487–493.
- Soloneski S., Reigosa M.A., Molinari G., González N.V. ve Larramendy M.L., 2008. Genotoxic and Cytotoxic Effects of Carbofuran and Furadan[®] on Chinese Hamster Ovary (CHO_{K1}) Cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656(1-2): 68-73.
- Sorsa M., Wilbourn J. ve Vainio H., 1992. Human Cytogenetic Damage as a Predictor of Cancer Risk. *IARC Sci. Publ.*, (116): 543-54.
- Tanaka T. ve Shimizu N., 2000. Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and micronucleation by lamin reorganization at S phase. *J. Cell. Sci.*, 113: 697–707.
- Testa A. ve Ranaldi R., 2002. Cytogenetic Biomonitoring of Workers from Laboratories of Clinical Analyses Occupationally Exposed to Chemicals. *Mutat. Res.*, 520: 73-82.
- The International Agency for Research on Cancer (IARC)., 2002. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 1, 1971 to vol. 82.
- Thomas P., Umegaki K. ve Fenech M., 2003. Nucleoplasmic Bridges are a Sensitive Measure of Chromosome Rearrangement in The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Mutagenesis*, 18 (2): 187–194.
- Titenko-Holland N., Windham G., Kolachana P., Reinisch F., Parvatman S., Osorio A.M. ve Smith M.T., 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed

- Using the Micronucleus Assay *in Vitro* and *In Vivo*: A Study of Malathion-Exposed Workers. *Mutat. Res.*, 15: 388(1): 85-95.
- Trizna Z. ve Schantz S.P., 1992. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North. Am.*, 25:1089–1103.
- Tronov V.A., Kramarenko II., Kozlova A.D., Dederer L.J., Kedrova A.G. ve Gorbacheva L.B., 2006. Sensitivity of Human Lymphocytes to Genotoxic Effect of N-Methyl-N-Nitrosourea: Possible Relation to Gynecological Cancers. *Exp. Oncol.*, 28 (4): 314-318.
- Tucker J.D. ve Preston R.J., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.*, 365:147–159.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2003. Pesticide Fact Sheet Name of Chemical: Boscalid.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2002. *The Office of Pesticide Program's Guidance Document on Methodology for Determining the Data Needed and the Types of Assessments necessary to make FFDCa Section 408 Safety Determinations for Lower Toxicity Pesticide Chemicals*. Retrieved May 07, 2010, from http://www.epa.gov/oppfead1/cb/csb_page/updates/lowertox.pdf
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005. *Inert (other) Ingredients in Pesticide Products*. Retrieved May 07, 2010, from <http://www.epa.gov/opp001/inerts/>
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2006. Terms of Environment: Glossary, Abbreviations and Acronyms. Glossary: F. Retrieved May 07, 2010, from <http://www.epa.gov/OCEPAt/terms/fterms.html>.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2009. *What is a Pesticide?*. Retrieved May 07, 2010, from <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.
- U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2008. *Fact Sheets on New Active Ingredients*. Retrieved April 25, 2008, from <http://www.epa.gov/opp001/>
- Umegaki K. ve Fenech M., 2000. Cytokinesis-block Micronucleus Assay in WIL2-NS Cells: A Sensitive System to Detect Chromosomal Damage Induced by Reactive Oxygen Species and Activated Human Neutrophils. *Mutagenesis*, 15 (3): 261–269.

- Vaglenov A.K. ve Karadjov A.G., 1997. Micronucleus Frequencies in Bulgarian Control Populations. *Cent. Eur. J. Occup. Environ. Med.*, 3: 187-194.
- Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S. ve Rodriguez A.V., 1998. In Vitro Genotoxic Effects of the Insecticide Deltamethrin in Human Peripheral Blood Leukocytes: DNA Damage ('Comet' assay) in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Toxicology*, 130: 129–139.
- Wang X., Thomas P., Xue J. ve Fenech M., 2004. Folate Deficiency Induces Aneuploidy in Human Lymphocytes *in Vitro*-Evidence Using Cytokinesis-Blocked Cells and Probes Specific for Chromosomes 17 and 21. *Mutat. Res.*, 551: 167–180.
- Weichental M., Roser M., Ehlert U., Frenzer S., Breitbart E.W. ve Rudiger H.W., 1989. Increased Numbers of Spontaneous Micronuclei in Blood Lymphocytes and Cultured fibroblasts of Individuals with Familial Cutaneous Malignant melanoma. *J.Cancer Res. Clin. Oncol.*, 264–268.
- Wilson C. ve Tisdell C., 2001. Why Farmers Continue to Use Pesticides Despite Environmental, Health And Sustainability Costs. *Ecol. Econ.*, 39: 449–62.
- World Health Organization (WHO) WHO/UNEP Working Group., 1990. Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture. Geneva.
- Yilmaz S., Aksoy H., Ünal F., Çelik M. ve Yüzbaşıoğlu D., 2008. Genotoxic Action of Fungicide Conan 5FL (Hexaconazole) on Mammalian Cells In Vivo and In Vitro. *Russian Journal of Genetics*, 44 (3): 273–278.
- Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., Yılmaz S., Unal F. ve Aksoy H., 2006. Clastogenicity of the Fungicide Afugan in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 604: 53–59.
- Yüzbaşıoğlu D., Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H. ve Çelik M., 2008. Genotoxicity Testing of Fuconazole *in vivo* and *in vitro*. *Mutat. Res.*, 649: 155–160.
- Zeljezic D. ve Garaj-Vrhovac V., 2004. Chromosomal Aberrations, Micronuclei and Nuclear Buds Induced in Human Lymphocytes by 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Pesticide Formulation. *Toxicology*, 200 (1): 39-47.
- Zhang L. ve Rothman N., 1996. Interphase Cytogenetics of Workers Exposed to Benzene. *Environ. Health Perspectives.*, 104: 1325-1329.

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 1.	Boscalidin çeşitli test sistemleri kullanılarak elde edilen genotoksisite sonuçları (FSC-PEC, 2004).....	21
Çizelge 2.	Pyraclostrobin ile yapılan toksisite çalışmaları.....	22
Çizelge 3.	Signumun toksikolojik özellikleri.....	28
Çizelge 4.	Araştırmada G ₀ ve siklusta ilerleyen lenfosit hücrelere uygulanan signum, boscalid ve pyraclostrobin konsantrasyonları (µg/ml).....	36
Çizelge 5.	Signumun bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	45
Çizelge 6.	Signumun erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	48
Çizelge 7.	Signumun iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	51
Çizelge 8.	Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	54
Çizelge 9.	Boscalidin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	57
Çizelge 10.	Boscalidin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	60
Çizelge 11.	Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	63
Çizelge 12.	Pyraclostrobin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀ fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksisite değerleri.....	66
Çizelge 13.	Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (G ₀	69

	fazı) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	
Çizelge 14.	Signumun bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	72
Çizelge 15.	Signumun erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	75
Çizelge 16.	Signumun iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	78
Çizelge 17.	Boscalidin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	81
Çizelge 18.	Boscalidin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	84
Çizelge 19.	Boscalidin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	87
Çizelge 20.	Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	90
Çizelge 21.	Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	93
Çizelge 22.	Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu % MNL, BNMN, NPB, NBUD frekansları ile CBPI ve % sitotoksosite değerleri.....	97
Çizelge 23.	Signum, boscalid ve pyraclostrobinin lenfositlerde oluşturduğu MN ve NPB frekansları arasında elde edilen korelasyon katsayıları ve NPB/MN oranları.....	109

Şekil 1.	(a) Tüm kromozom ve asentrik kromozom parçasından MN oluşumu, (b) Zıt kutuplara çekilen disentrik kromozomun oluşturduğu NPB ve beraberinde oluşan MN. Bölünen hücrelerde sitokalsin-B'nin binukelat aşamasındaki rolü.....	5
Şekil 2.	Asentrik kromozom/kromatid parçalarından MN oluşumu.....	7
Şekil 3.	Tubulin ipliklerinin kinetokora yanlış bağlanmasından dolayı kutuplara çekilemeyen kromozom/kromatidlerden oluşan MN.....	7
Şekil 4.	Tubulin depolimerizasyonu sonucu kutuplara çekilemeyen kromozom / kromatidlerin oluşturduğu MN.....	8
Şekil 5.	Sentomerik DNA, kinetokor veya kinetokor proteinlerindeki hasarlanmalar sonucu oluşan MN.....	8
Şekil 6.	Geç replikasyon, kromozom/kromatidlerin nukleus periferasında bulunmaları ve histon proteinlerinin epigenetik modifikasyonu sonucu oluşan MN.....	9
Şekil 7.	İki kromozom kırığının yanlış tamir edilmesi sonucu oluşan nukleoplazmik köprü ve/veya oluşan köprünün kırılması sonucu oluşan MN.....	9
Şekil 8.	Telomer uç birleşmesi ve oluşan köprülerin kırılması sonucu oluşan MN	9
Şekil 9.	Nukleusun spesifik bölgelerinde seçici olarak lokalize olan gen amplifikasyon bölgelerinin BFB siklusu sonucunda oluşturduğu MN..	10
Şekil 10.	A: Mononukleat hücre, B: BN hücre C: Polinukleat hücre, D: Nekrotik hücre, E: Apoptotik hücre, F: MN, G: NPB ve MN, H: NBUD.....	12
Şekil 11.	Boscalid.....	29
Şekil 12.	Pyraclostrobin.....	29
Şekil 13.	Mitomisin C.....	31
Şekil 14.	Dimetil Sulfoksit.....	31
Şekil 15.	Sitokalsin B.....	32
Şekil 16.	Fungisitlerin G ₀ fazı lenfositleri ile muamele protokolü (Fenech, 2007).	35
Şekil 17.	Fungisitlerin siklusta ilerleyen lenfositler ile muamele protokolü.....	35
Şekil 18.	CBMN tekniği sonucu oluşan hücre çeşitleri. a: tek çekirdekli, b: çift çekirdekli, c:üç çekirdekli, d: dört çekirdekli hücreler.....	39

Şekil 19.	Signumun bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	44
Şekil 20.	Signumun erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	47
Şekil 21.	Signumun her iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	50
Şekil 22.	0,25 μ g/ml signum ile G_0 fazı lenfositleri muamelesi sonucu oluşan 1 mikronukleuslu binukleat hücre.....	50
Şekil 23.	Boscalidin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	53
Şekil 24.	Boscalidin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	56
Şekil 25.	Boscalidin her iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	59
Şekil 26.	Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	62
Şekil 27.	Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	65
Şekil 28.	Pyraclostrobinin her iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (G_0 fazı) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	68
Şekil 29.	Signumun bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	71
Şekil 30.	Signumun erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	74
Şekil 31.	Signumun iki donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	77
Şekil 32.	1 μ g/ml signum ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan NPB'li binukleat hücre.....	77
Şekil 33.	Boscalidin bayan donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama ± 1 SH).....	80
Şekil 34.	Boscalidin erkek donörden alınan periferal kan lenfositlerinde (siklusta	83

	ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH).....	
Şekil 35.	Boscalidin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH).....	86
Şekil 36.	6 μ g/ml boscalid ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan 2 ve 3 mikronukleuslu binukleat hücreler.....	86
Şekil 37.	Pyraclostrobinin bayan donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)..	89
Şekil 38.	Pyraclostrobinin erkek donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN frekansları (Ortalama \pm 1 SH)..	92
Şekil 39.	Pyraclostrobinin iki donörden alınan periferel kan lenfositlerinde (siklusta ilerleyen) oluşturduğu BNMN, NPB ve NBUD frekansları (Ortalama \pm 1 SH).....	95
Şekil 40.	0,5 μ g/ml pyraclostrobin ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan onbir mikronukleuslu binukleat hücre.....	95
Şekil 41.	1 μ g/ml pyraclostrobin ile siklusta ilerleyen lenfositlerin muamelesi sonucu oluşan NPB'li binukleat hücre.....	96
Şekil 42.	Signum ve boscalid ile muamele edilen G ₀ fazı lenfositlerinde elde edilen BNMN frekanslarının karşılaştırılması.....	101
Şekil 43.	Signum ve boscalid ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde elde edilen BNMN frekanslarının karşılaştırılması.....	102
Şekil 44.	Signum, boscalid ve pyraclostrobin ile muamele edilen G ₀ fazı lenfositlerinde elde edilen CBPI değerlerinin karşılaştırılması.....	113
Şekil 45.	Signum, boscalid ve pyraclostrobin ile muamele edilen siklusta ilerleyen lenfositlerde elde edilen CBPI değerlerinin karşılaştırılması...	114

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Akın ÇAYIR

Doğum Yeri: Afşin

Doğum Tarihi: 25/05/1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim

Dalı, Genel Biyoloji Programı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLER

a) Yayınlar-SCI-Diğer

a. SCI

- 1- Coskun M., Coskun M., **Çayır A.**, ve Ozdemir O., 2011. Frequencies of Micronuclei (MNi), Nucleoplasmic Bridges (NPBs), and Nuclear Buds (NBUDs) in Farmers Exposed to Pesticides in Canakkale, Turkey. *Environment International*, 37(1): 93-96.
- 2- Coskun M., **Çayır A.**, Coskun M., ve Kilic O., 2011. Heavy Metal Deposition in Moss Samples from East and South Marmara Region, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1-4): 219-227.
- 3- **Çayır A.**, Coskun M., ve Coskun M., 2010. The heavy metal content of wild edible mushroom samples collected in Canakkale province, Turkey. *Biological Trace Element Research*, 134(2): 212-219.
- 4- Coskun M., Steinnes E., Coskun M, ve **Cayir A.**, 2009. Comparison of epigeic moss (*Hypnum cupressiforme*) and lichen (*Cladonia rangiformis*) as biomonitor species of atmospheric metal deposition. *Environmental Contamination and Toxicology*, 82(1): 1-5.
- 5- Coskun M., Yurukova L., **Çayır A.**, Coskun M., ve Gatcheva G., 2009. Cross-border Response of Mosses to Heavy Metal Atmospheric Deposition in Southeastern Bulgaria and European Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 157(1-4): 529-537.

- 6- Yurukova L., Tsakiri E., ve **Çayır A.** 2009. Cross-border Response of Moss, *Hypnum cupressiforme* Hedw., to Atmospheric Deposition in Southern Bulgaria and Northeastern Greece. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(2): 174-179.
- 7- Kılıc O., Belivermis M., Topçuoğlu S., Çotuk Y., Coskun M., **Çayır A.**, ve Küçer R., 2008. Radioactivity Concentrations and Dose Assessment in Surface Soil Samples from East and South of Marmara Region, Turkey, *Radiation Protection Dosimetry*, 128: 324-330.
- 8- Belivermis M., Kılıc O., Çotuk Y., Topçuoğlu S., Coskun M., **Çayır A.**, ve Küçer R., 2008.. Radioactivity concentrations in topsoil samples from Thrace region of Turkey and assessment of radiological hazard. *Radiation Effects and Deffects in Solids*, 163(11): 903-913.
- 9- **Çayır A.**, Coskun M., ve Coskun M., 2008. Concentrations of some elements in the Bioindicator Organism *Cladonia rangiformis* Collected at the Vicinity of Çanakkale. *Ekoloji*, 18-69: 7-13.
- 10- **Çayır A.**, Coskun M., ve Coskun M., 2007. Determination of Atmospheric Heavy Metal Pollution in Canakkale and Balıkesir Provinces Using Lichen (*Cladonia rangiformis*) as a Bioindicator. *Environmental Contamination and Toxicology*, 79(4): 367-370.
- 11- Coskun M., Frontasyeva M.V., Steinnes E., Çotuk A.Y., Pavlov S.S., Coskun M., Sazanov A.S., **Çayır A.**, ve Belivermis M., 2005. Atmospheric Deposition of Heavy Metals in Thrace Studied by Analysis of Moss (*Hypnum cupressiforme*). *Environmental Contamination and Toxicology*, 74(1): 201-209.

b) Bildiriler-Uluslararası-Ulusal

a. Uluslararası

- 1- Yurukova L.D., Coskun M., Gecheva G.M., **Çayır A.**, ve Coskun M., 2008. Transboundary Airborne Deposition Estimated By the Moss *Hypnum Cupressiforme* Hedw. In Southeastern Bulgaria-European Turkey. Proceedings of The Anniversary Scientific Conference of Ecology Plovdiv, 300-307.
- 2- Coşkun M., Frontasyeva M.V., E Steinnes., Pavlov S.S., Sazanov A.S., Çotuk A.Y., Coşkun M., ve **Çayır A.**, 2003. NAA and AAS of moss samples used to study air pollution in the Thrace region, Turkey XII. International Conference on Selected Problems of Modern Physics. Abstract, 8-11 June, Dubna, Russia.

- 3- Coşkun M., Frontasyeva M.V., Steinnes E., Pavlov S.S., Sazanov A.S., Çotuk A.Y., Coşkun M., ve **Çayır A.**, 2003. Air Pollution Study in the Thrace region, Turkey” Fifth General Conference of the Balkan Physical Union. Abstract, August 25–29, Vrnjacka Banja, Serbia and Montenegro.
- 4- Belivermiş M., Kılıç Ö., Çotuk Y., Coşkun M., **Çayır A.**, ve Küçer R., 2006. Distribution of Gamma Emitting Radionuclides in Soils from Thrace, Turkey In-situ Nuclear Metrology as a toll for Radioecology (INSINUME`2006) 6-8 Ekim, İzmir, Turkey.
- 5- Kılıç Ö., Belivermiş M., Çotuk Y., Coşkun M., **Çayır A.**, ve Küçer R., 2006. Determination of Cs-137 Activities in Soil Samples from East and South of Marmara’ Region, Turkey. In-situ Nuclear Metrology as a toll for Radioecology (INSINUME`2006) 6-8 Ekim, İzmir Turkey.

b. Ulusal

- 1- Coşkun M., Kovancı A., Coşkun M., ve **Çayır A.**, 2008. Çanakkale Şehir Şebeke Suyunda Ağır Metal Analizi ve Bakteriyolojik İnceleme, Çanakkale Merkezi Değerleri Sempozyumu, Çanakkale.
- 2- Coşkun M., **Çayır A.**, Kovancı A., ve Coşkun M., 2008. Çanakkale'de Pestisid uygulayan çiftçilerde Mikronukleus sıklığı, Çanakkale Merkezi Değerleri Sempozyumu,25-26 Ağustos 2008, Çanakkale.
- 3- Coşkun M., **Çayır A.**, Coşkun M., Coşkun M., ve Kılıç Ö., 2007. Doğu ve Güney Marmara Bölgesinde Atmosferik Ağır Metal Dağılımının Belirlenmesi, 2007 Ulusal Çevre Sempozyumu Mersin.
- 4- Kılıç Ö., Belivermiş M., **Çayır A.**, Küçer R., Coşkun M., ve Çotuk Y., 2007. Marmara Bölgesi Yüzey Toprağı Örneklerinde Gama Yayan Radyonüklid Aktivite Konsantrasyonlarının Belirlenmesi, 2007 Ulusal Çevre Sempozyumu Mersin.
- 5- Coşkun M., **Çayır A.**, Coşkun M., ve Kovancı A., 2006. Radyonüklidler ve İnsan Sağlığı. Radyasyon ve Çevre Sempozyumu–2006 (Ayvacık-Çanakkale)
- 6- Coşkun M., **Çayır A.**, ve Coşkun M., 2006. Biyolojik Dozimetride Kromozom Dozimetrisinin Yeri ve Önemi, Radyasyon ve Çevre Sempozyumu–2006 (Ayvacık-Çanakkale).

- 7- Belivermiş M., Kılıç Ö., **Çayır A.**, ve Çotuk Y., 2007. İstanbul'dan Toplanan Karayosunu, Liken, ve Toprak Örneklerinde Ağır Metal Konsantrasyonlarının Mevsimsel Değişimi, 2007 Ulusal Çevre Sempozyumu Mersin.
- 8- Coskun M., **Çayır A.**, Coskun M., ve Kılıç Ö., 2007. Doğu ve Güney Marmara Bölgesinde Atmosferik Ağır Metal Dağılımının Belirlenmesi, 2007 Ulusal Çevre Sempozyumu Mersin.
- 9- **Çayır A.**, Coskun M., ve Coskun M., 2007. Çanakkale İli ve Çevresinde Toplanan Liken Örneklerinde Ağır Metal Analizi, 2007 Ulusal Çevre Sempozyumu, Mersin.
- 10- **Çayır A.**, Coşkun M., Coşkun Mahmut., 2006. Ultraviyole (UV) Radyasyonu ve Canlılar Üzerine Etkileri. Radyasyon ve Çevre Sempozyumu–2006 (Ayvacık-Çanakkale).
- 11- **Çayır A.**, Çotuk A.Y., Coşkun M., ve Kılıç Ö., 2006. Pb, Cu, Cd, Zn Elementlerinin Trakya Bölgesi Dağılımlarının Biyoizleyici Olarak Karayosunun Kullanıldığı Bir Teknikle Belirlenmesi, III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (05–07 Temmuz 2006 Çanakkale).
- 12- **Çayır A.**, Coşkun M., ve Coşkun M., 2006. Biyoizleyici Olarak Likenler ve Pb, Cu, Cd, Zn Elementlerinin Trakya Bölgesi Dağılımlarının Belirlenmesi', III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (05–07 Temmuz 2006 Çanakkale).
- 13- Coşkun M., **Çayır A.**, Kılıç Ö., Coşkun M., ve Kovancı A., 2006. Doğu ve Güney Marmara Bölgesi Yüzey Toprağında Ağır Metal Dağılımı III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi (05–07 Temmuz 2006 Çanakkale).

c) Katıldığı Projeler

- 1- Pestisitlere Maruz Kalan Sera Çiftçilerinde Olası Sitogenetik Hasarın Periferal Kan Lenfositleri ve Ağız Mukoza Epitel Hücrelerinde Mikronukleus Frekansı ile Belirlenmesi, COMÜ-BAP
- 2- Karayosunu Biyomonitöring Tekniğini Kullanarak Güney Bulgaristan ve Trakya Bölgesinde Atmosferik Toksik Metal Kirliliğinin Belirlenmesi ve Avrupa Birliği 2005/2006 (EU UNECE-ICP 2005/2006, BAS (Bulgaristan) ve TÜBİTAK
- 3- Signum Pestisidi ve Aktif Maddelerinin In Vitro Şartlarda İnsan Periferal Kan Lenfositleri Üzerine Mikronukleus Oluşturma Etkilerinin Araştırılması, COMU-BAP

- 4- Çanakkale İli İnsan Popülasyonunda Sitogenetik Hasarın Doğal Sıklığının Belirlenmesi, COMU-BAP
- 5- Çanakkale Şehir Şebeke Suyunda Ağır Metal Analizi, COMU-BAP
- 6- Çanakkale Çevresinde Pestisid Uygulayan Çiftçilerin Sitogenetik Biyomonitoring, COMU-BAP
- 7- Doğu ve Güney Marmara Bölgesi Atmosferik Ağır Metal Kirliliğinin Karayosunu Biomonitoring Tekniğini Kullanarak Belirlenmesi, TÜBİTAK

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

- 1-Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, 2005-Devam ediyor
- 2-The National Hellenic Research Foundation, The Institute of Biological Research and Biotechnology-Atina, Eylül 2009-Şubat 2010 (ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility) Training Fellowship).

İLETİŞİM

E-posta adresi: acincay79@yahoo.com