



**2-KLOROPİRİDİN'İN ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Güller PİRDAL

**T.C. UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN, 2019

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**2-KLOROPİRİDİN'İN ALLİUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Güller PİRDAL

**HAZİRAN 2019
UŞAK**

**T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**2-KLOROPİRİDİN'İN ALLİUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ
ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Güller PİRDAL

UŞAK 2019

Güller PİRDAL tarafından hazırlanan “**2-Kloropiridin’in *Allium cepa* L. Kök Meristem Hücreleri Üzerine Sitogenetik ve Genotoksik Etkileri**” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Recep LİMAN

Tez Danışmanı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

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

Prof.Dr. Safiye Elif KORCAN

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Recep LİMAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi

Tarih: 19/06/2019

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

Doç. Dr. Murat Kemal KARACAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Güller PİRDAL



2-KLOROPİRİDİN'İN ALLIUM CEPA L. KÖK MERİSTEM HÜCRELERİ ÜZERİNE SİTOGENETİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Güller PİRDAL

UŞAK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

2-Kloropiridin (2-KP) kozmetiklerin, böcek ilaçlarının ve diğer farmasötik ürünlerin önemli bir öncüsüdür ve aynı zamanda endüstriyel atık sularındaki tarımsal kimyasal ürünlerin ve nehir kirleticilerin metabolitlerinin ürünleri olarak, iz kimyasal olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada, 2-KP'nin sitotoksik ve genotoksik etkileri *Allium cepa* kök meristematik hücrelerinde 2-KP'nin kök büyümesi, mitotik indeks (Mİ), kromozomal anormallik (KA)'ler ve DNA hasarı üzerindeki etkileri *Allium anafaz-telofaz* ve Komet testleri kullanılarak araştırılmıştır. 2-KP'nin EC₅₀ değeri *Allium* kök büyümesini engelleme testi ile yaklaşık olarak 50 ppm belirlenmiştir. *A. cepa* köklerine ½xEC₅₀ (25 ppm), EC₅₀ (50 ppm) ve 2xEC₅₀ (100 ppm) 2-KP, Metil metansülfonat (MMS-10 ppm, pozitif kontrol) ve saf su (negatif kontrol) konsantrasyonları *A. cepa* soğan kök hücrelerine farklı zamanlarda (24, 48, 72 ve 96 saat) uygulanmıştır. 2-KP, kök büyümesini ve Mİ'yi azaltarak sitotoksik etki göstermişken, KA'ları (bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, anafaz köprüleri ve poliploidi) ve DNA hasarını önemli seviyelerde arttırarak genotoksik etki göstermiştir. Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile *Allium* köklerine geçen 2-KP miktarı hem süreye hem de doza bağlı olarak artmıştır.

Bilim Kodu:

Anahtar Kelimeler: 2-Kloropiridin, *Allium cepa*, Anafaz-Telofaz Testi, Komet Testi

Sayfa Adedi: 124

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Recep LİMAN

**THE CYTOGENETIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF 2-CHLOROPYRIDINE
ON ALLIUM CEPA L. STEM MERY CELLS**

(M.Sc. Thesis)

Güller PİRDAL

UNIVERSITY OF USAK

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

2-Chloropyridine (2-KP) is an important precursor of cosmetics, pesticides and other technologies, as well as the chemical structure of agricultural chemicals in industrial wastewater and the trace chemical for the products of metabolites of river pollutants. Here, 2-KP is cytotoxic and genotoxic in *Allium cepa* root meristematic environment 2-KP root development, mitotic index (MI), chromosomal abnormality (KA)'s DNA and DNA damage are dried. The EC₅₀ value of 2-KP is approximately 50 ppm by the *Allium* root growth inhibition test. *A. cepa* roots ½xEC₅₀ (25 ppm), EC₅₀ (50 ppm) and 2xEC₅₀ (100 ppm) 2-KP, methylmethanesulfonate (MMS-10 ppm, positive control) and distilled water (negative control) (24, 48, 72 and 96 hours). When 2-KP shows cytotoxic effects by decreasing root growth and MI, it significantly affects CAs (impaired anaphase-telophase, persistent chromosome, adhesion, anaphase bridges and polyploidy) and DNA damage. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and the number of 2-KP's that passed into *Allium* roots increased both time and dose.

Science Code:

Keywords: 2-Chloropyridine, *Allium cepa*, Anaphase-Telophase Test, Comet Test

Number of Page: 124

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Recep LİMAN

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Doç. Dr. Recep LİMAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım süresince her daim desteğini gördüğüm çalışma arkadaşım ve dostum öncelikle Seçil ÖZKAN'a, laboratuvar çalışmalarımı bana yardımda bulunan diğer değerli arkadaşlarım Eslem AMAÇ'a, Hande AYTUĞ'a, Bermal BAŞBUĞ'a ve yardımda bulunan diğer arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Bu yoğun sürecimde manen her zaman yanımda olan ve beni destekleyen değerli Ufuk YAŞAR'a teşekkür ederim. Öğrenim hayatım boyunca sonsuz desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan değerli ve kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Güller PİRDAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Organik Kirleticiler.....	3
2.2. Pestisitler.....	5
2.2.1. Pestisitlerin Özellikleri.....	6
2.2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	6
2.2.3. Pestisitlerin Kullanımı.....	9
2.2.4. Pestisitlerin Yayılımı.....	12
2.2.5. Pestisitlerin Bulaşma Yolları.....	14
2.2.6. Pestisitlerin Çevre ve İnsan Üzerine Etkileri	15
2.3. Piridin ve Piridin Bileşikleri	17
2.3.1. 2-Kloropiridin.....	20
3. GENEL BİLGİLER.....	22
3.1 Mitoz Bölünme	22
3.1.1. Mitoza Genel Bakış.....	23
3.1.2. Mitoz Bölünme Nedenleri.....	24
3.1.3. İnterfaz	25
3.1.4. Mitoz Bölünme Aşamaları	27
3.2. Mutasyonlar	31
3.2.1. Mutajenler	32
3.2.2. Gen Mutasyonları.....	34

3.2.3. Kromozom Mutasyonları	36
3.3. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları	41
3.3.1. Direkt Onarım ya da Hasarın Geri Döndürülmesi	41
3.3.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Onarımı.....	42
3.3.3. Rekombinasyonel Onarım.....	44
3.3.4. SOS Onarımı	44
3.3.5. DNA Çift Zincir Kırığı Onarımı	45
3.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Bazı Yöntemler	45
3.4.1. Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi.....	46
3.4.2. Kromozomal Anormallik (KA) Testi	48
3.4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi	50
3.4.4. Mikronükleus (MN) Testi	52
3.4.5. Allium Testi.....	53
3.4.6. Tek Hücre Jel Elektrophorez Yöntemi (Komet Testi).....	57
4. MATERYAL ve METOT	61
4.1. Materyal	61
4.1.1. Çalışmada Kullanılan Organizma	61
4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	63
4.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	64
4.2. Metot.....	69
4.2.1. Allium Testi.....	69
4.2.2. Komet Testi	70
4.2.3. <i>A. cepa</i> Kök Meristem Hücrelerinde 2-KP Tayini (LC-MS/MS)	72
4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	73
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	74
5.1. Büyüme Engelleme Testi.....	74
5.2. 2-Kloropiridin'in Mitotik İndeks Üzerine Etkisi	76
5.3. 2-Kloropiridin'in Neden Olduğu Kromozomal Anormallikler	78
5.4. Allium Komet Testine Ait Bulgular	82
5.5. 2-Kloropiridin'in LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi	84

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	108



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Pestisitlerin Kullanıldıkları Zararlı Grubuna Göre Sınıflandırma	7
Çizelge 2.2. Türkiye’de 2006-2016 yılları arasında gruplarına göre pestisit kullanımı.....	11
Çizelge 2.3. Piridin kimyasalının moleküler yapısı.....	17
Çizelge 2.4. Piridin’in bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	18
Çizelge 2.5. 2-KP kimyasalının moleküler yapısı	20
Çizelge 2.6. 2-KP’nin kimyasal ve fiziksel bazı özellikleri	21
Çizelge 3.1. Muatsyonlara sebep olan bazı endojen ve ekzojen etkenler.....	32
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	63
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar	64
Çizelge 4.3. Kütle spektrometresi koşulları.....	74
Çizelge 5.1. 2-KP’nin <i>A. cepa</i> kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları	76
Çizelge 5.2. 2-KP’nin <i>A. cepa</i> kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi	78
Çizelge 5.3. <i>A. cepa</i> kök meristematik hücrelerinde 2-KP’nin neden olduğu kromozomal anormallikler.....	80
Çizelge 5.4. 2-KP’nin <i>A. cepa</i> kök meristematik hücrelerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti.....	83
Çizelge 5.5. 2-KP’nin <i>A. cepa</i> kök meristem hücrelerinde LC-MS/MS ile kantitatif analizi	85

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.2. Pestisitlerin çevredeki sirkülasyonu	13
Şekil 3.1. Hücre siklusu	25
Şekil 3.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları	26
Şekil 3.3. Delesyon, duplikasyon, inversiyon ve karşılıklı traslokasyonun gösterilmesi....	39
Şekil 3.4. Ames testinin uygulama aşamaları ve mutajeniteyi gösteren koloniler.....	48
Şekil 3.5. Metafaz hücrelerinden elde edilen kromozomal anormallikler	49
Şekil 3.6. Kardeş kromatit değişiminin BrdU ile saptanması ve KKD içeren metafaz plakları	50
Şekil 3.7. Klastojenlerin ve anojenlerin etkisiyle uyarılan hücrelerdeki MN'ler.....	53
Şekil 3.8. Alkali Komet tekniğinde basamakların şematik gösterimi.....	58
Şekil 3.9. Farklı derecelerdeki DNA hasarının mikroskop altındaki görüntüsü	59
Şekil 3.10. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri.....	61
Şekil 4.1. <i>A. cepa</i> L.'nin Karyotipi.....	62
Şekil 5.1. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri.....	84

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mitoz bölünme safhaları.....	27
Resim 5.1. 2-KP'nin büyümeyi engelleme testi.....	75
Resim 5.3. 2-KP'ye maruz bırakılmış <i>A. cepa</i> kök hücrelerinde görülen anafaz-telofaz anormallikleri.....	81



SİMGELER ve KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
cm	Santimetre
°C	Derece santigrat
EC ₅₀	%50 etkili konsantrasyon (EC=Effective Concentration)
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
N	Normal
ppb	Milyarda bir kısım (Parts Per Billion=ng/mL) çözelti
ppm	Milyonda bir kısım (Parts Per Million µg/mL) çözelti
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
2-KP	2-Kloropiridin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
KA	Kromozomal Anormallik
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
LMPA	Düşük Erime Noktalı Agaroz
MI	Mitotik İndeks

MMS

Metil Metan Sülfonat

MN

Mikronükleus

NMPA

Normal Erime Noktalı Agaroz



1. GİRİŞ

2-Kloropiridin (2-KP) pestisitlerin, kozmetik ürünlerinin ve farmasötik diğer çeşitli ürünlerin üretiminde bir ara ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Endüstriyel atık sularda, su kirleticisi ve tarım ilaçlarının bir iz organik kimyasal metaboliti olarak tanımlanmıştır [1]. Dünyamızdaki su habitatu ciddi bir dozda zirai kimyasal bileşikleri, farmasötik ve çeşitli kozmetik ürünlerinin üretiminde ortaya çıkan çeşitli kimyasalları değişik şekillerde yapısına almaktadır. 2-KP, sucul ortama çeşitli şekillerde girebilmektedir. 2-KP, ya endüstriyel çalışma alanlarının atıkları vasıtasıyla rastgele doğaya salınırlar, ya da ilaçların metabolik ürünleri olarak hayvan veya insan vücuduna alınmaktadır. Pestisitleri işleyebilen spesifik ürünleri içeren veya içermeyen bitkiler ile bir çok çeşitli şekillerde ortama karışabilmektedirler. 2-KP, doğada kullanımı yaygın olmayan bir kimyasal olsa bile doğadaki kalıntıları, zirai ilaçlara ve ilgili farmasötiklere direnç gösteren oluşumların ortaya çıkmasına sebep olur ve bu nedenle etkilerini azaltmaktadır [2-8]. 2-KP, çoğunluk olarak antropojenik kökenli bir çevre kirleticisidir.

Kimyasalların, sitotoksik ve genotoksik etkileri, bakteriyel, hayvansal ve bitkisel test sistemleri ile saptanabilmektedir. Çevresel kirleticilerin sitogenotoksik etkilerini değerlendirmek için Allium testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Soğanın saklanması ve kullanımı kolay olduğu için kök ucu hücreleri, mikroskobik (EC₅₀, büyüme) ve makroskobik parametreler (Mİ ve KA gibi c-mitoz, mikronükleus ve yapışkanlık, kromozom sayısı vb.) için uygun bir sistem oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu test sistemi Dünya Sağlık Örgütü, ABD Çevre Koruma Ajansı ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı tarafından onaylanmıştır. Ek olarak, Allium test sonuçları diğer prokaryotik ve ökaryotik test sonuçları ile birlikte iyi bir uyum göstermektedir [9-19].

A. cepa kök meristematik hücrelerinde Komet testi veya tek hücreli jel elektroforezi, çevresel kirleticisi maddelerin DNA hasarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu test nispeten düşük maliyetli, basit, hızlı ve güvenilirdir. Tekrarlanabilir sonuçlar verir ve mitozdan bağımsız olarak az sayıda hücreden bağımsız olarak incelenebilmektedir [20-26].

Kütle spektrometresi (LC-MS/MS), analiz örneğinin iyonlaştırılması, buharlaştırılması ve oluşan iyon parçalarının kütle/yük (m/e veya m/z) değerlerine bakılarak ayrılması ve kaydedilmesi işlemleri için geliştirilmiş bir cihazdır.

Bu çalışmada, 2-KP'nin *A. cepa*'da kök meristemik uçlarındaki büyüme, KA'ları ve DNA hasarı üzerindeki etkileri *Allium* anafaz-telopfaz ve Komet testi ile araştırılmıştır. *A. cepa* kök uçlarına geçen 2-KP miktarı ise LC-MS/MS cihazı ile belirlenmiştir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Organik Kirleticiler

Günümüz dünyasında insan sağlığı, yaşadığı çevreden aldıkları ve onları oluşturan genetik miras etkileri ile değişmektedir. İnsanlar, daha embriyo döneminde iken çeşitli çevresel koşullar ile etkileşim olmaktadır. Bu etkileşim, artarak veya azalarak insan yaşamı boyunca süre gelmektedir.

Sanayi devrimi, insan yaşamına ve buldukları topluma kolaylık getirmiş olup, ürettikleri çeşitli kimyasallar, gübreler, pestisitler ve benzeri gibi çeşitli süni ürünleri yaşamlarının bir parçası haline getirmişlerdir. İçinde bulunduğumuz yüzyılın başlarında kullanılan kimyasalların miktarı birkaç bini geçmezken, şu anda daha çabuk gelişen endüstriler, kullanıma hazır halde olan binlerce kimyasal çeşidini dünyaya sunmuşlardır. Günümüzde büyük bir çoğunluğu endüstri üretimi olan 70,000 civarında çeşitli kimyasal maddenin birçok amaç için kullanıldığı bilinmektedir. Canlılarda ve özellikle insanlarda, dünyanın her bir yerinde bulunabilen ve üretilen insan yapımı bu çok çeşitli kimyasal maddelerin kalıntıları ve izleri görülmektedir [27]. Bu zamana yaklaştıkça, üretilen bu çeşitli kimyasalların olumsuz etkileri dünyadaki canlılar üzerinde görülür hale gelmeye başlamıştır. Çeşitli üretilen bazı kimyasallarla etki altında kaldığında geri dönüşü olmayan, kalıcı hasarlar ortaya çıkardığı görülmeye başlanmıştır.

Sanayi üretimi kimyasallar; her türlü endüstri için yardımcı olabilecek türde üretilmişlerdir. Bunlardan biri olan pestisitler, zararlı organizmaların çoğalmalarını kontrol etmek ve onlardan korunmak gibi nedenlerle yapılan çeşitli maddelerdir [27].

Endüstriyel pestisitler ve kimyasalların diğerleri ise çeşitli atıkların ya da pestisitlerin yakılması eylemlerinde yan ürün olarak oluşurlar ve bunlara “yan ürün olarak oluşan organik kirleticiler” ya da “istenmeden oluşan organik kirleticiler” denilmektedir. Organik kirleticiler, biyolojik ve kimyasal olarak bozulmaya karşı dayanıklılık göstermektedir. Doğal ortamda uzun süre boyunca ayrışmadan ya da bozulmadan kalabilmektedir [27].

Organik kirleticilerin su ortamında çözünmeleri azdır, bu nedenle de yağ ya da yağ içeren dokularda iyi bir şekilde çözünürler ve o ortamda birikerek önemli sağlık sorunlarına yol açabilmektedirler [27]. Organik kirleticiler, doğal ortamda, onları tehlikeli kılan üç özelliğe de sahiptirler; kalıcılık, toksisite, biyoakümülyasyon. Bunlar arasında biyoakümülyasyon, en ciddi sorun yaratandır. Organik kirleticiler buldukları çevreyi kirletmelerinin yanı sıra, hava akımları, nehirler ve okyanus akıntıları ile de tüm dünyayı gezerek daha fazla alana yayılıp zarar verebilmektedir. Bugün dünyamızda, Kuzey Kutbu da dahil olmak üzere gibi uzak bölgeleri dahi kirletmiş durumdadırlar [28]. Organik kirleticilerin bütün dünyada yaşamı, doğayı ve çevreyi kirlettiğine dair bilimsel kanıtlar bulunmaktadır. Gıda sektörü, insanların ve doğal yaşamın bu kirleticilerle etki altında kalmasındaki en önemli etkidir. Organik kirleticiler; plasenta yoluyla fetüse ve anne sütü yoluyla da bebeğe geçebilmektedir [28].

Organik kirleticilere örnek olarak; Heksaklorobenzen, Poliklorlu Bifeniller, Dioksinler ve Furanlar, Aldrin, Endrin ve Klordan, Dieldrin, Mireks, Heptaklor, Toksafen Polibromlu Bifeniller, ve Endosülfan verilebilir [28].

Endüstri devrimi, çeşitli kimyasalın yaşamımıza girmesine ve bunların zorunlu olarak tüketilmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle insanlar yaşamları boyunca bu kimyasalların etkisi altında kalmaktadır. Gelecek yıllarda dünya nüfusunun artması düşünüldüğünde, bu zararlı kirleticilerin yarattığı sorunların daha da artacağı düşünülmektedir.

2.2. Pestisitler

Günümüz dünyasında ki tartışılan en önemli konulardan biri artan dünya nüfusuna karşılık gerekli besin gereksiniminin karşılanıp karşılanmadığıdır. Bu nedenle tarım için kullanılan alanların azalması ve yok olması bu konuyu daha önemli hale getirmektedir. Bu amaçla, verimi zarar uğratan çeşitli etkenlere karşı çeşitli kimyasal maddeler üretilmiştir. Bu kimyasalların üretimi ve kullanımı kolay ve hemen etki etmesinden dolayı otların ve bitkilerin hastalıklardan korunması ve sağlıklı ürünler elde etmek isteğimizden dolayı tarımsal bir mücadele olan pestisitler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [29, 30].

Pestisitler, çok eski tarihlerden beri yaygın olarak kullanılan kimyasallardır. İnsektisit kullanımına dair M.Ö. 1500'lü yıllarda papirüs üzerindeki pire, eşek arılarına ve bite karşı kayıtlar bulunmuştur. Pestisit olarak kullanılan ilk madde Kükürt ve Arseniktir. Bahçe böcekleriyle savaşta ilk olarak Arsenikten faydalanmışlardır. Sonralarda nikotin maddesi eklenmeye başlanmış, civa ve kurşun gibi çeşitli kimyasallarda eklenmiştir. İsviçreli kimyacı Paul Mueller, 1939 senesinde pestisit özellikte olan DDT'yi (diklorodifenil trikloroetanum) belirtmiş ve pestisitler 1940'lı yıllarda zararlı böceklerle karşı kullanılmıştır. Ancak DDT'nin toksik bir etkisinin olduğu, ekolojiye ve insan sağlığına zararı nedeni ile yasaklanmıştır. Bu nedenle pestisitlerin yararlarının yanı sıra zararlarının da olduğu bilinmiştir.

Pestisitler, insanların tükettiği gıdalarda bulunan ve istenmeyen hayvanları ve bitkileri yok etmek amacıyla kullanılan çeşitli kimyasal maddeler olarak ortaya çıkmıştır. Pestisitler günümüz tarımında oldukça yaygın kullanılarak, zararlı ve istenmeyen organizmaları yok etmek, üremelerini kontrol altına almak ve etkili olan zararlarını yok etmek veya azaltmak amacıyla kullanılan bakteri ya da virüs gibi biyolojik bir etken, kimyasal bir madde ya da dezenfektan ve antimikrobiyal olabilmektedirler.

Bilinçli olarak ve yeterli miktarda kullanıldıklarında pestisitler, tarımsal ürünlerin ve insan sağlığının korunmasında yararlı kimyasallardır. Fakat fazla ve bilinçsiz tüketimi, çevreye, insan sağlığına, besinlere zarar vermektedir. Ekosisteme yayılarak, çeşitli yollarla canlıların sistemine girerek yapısını bozmakta, toprak, su ve hava kirliliğine neden olarak ekosistemi etkilemekte ve bu denli durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır [31, 32].

2.2.1. Pestisitlerin Özellikleri

Formülasyon, zirai ilaçların, yardımcı ve aktif maddelerin karıştırılması ile elde edilebilmektedirler.

İlaç formülasyonunu oluşturan maddeler:

- Dolgu maddeleri: Formülasyonun etkin madde kısmını oluşturan dolgu maddeleri, kimyasal bileşiklerle tepkimeye girmemektedir.
- Aktif veya etken madde: Formülasyon içindeki öldürücü ana maddeye aktif madde veya etken madde denilmektedir.
- Yardımcı maddeler: Pestisitlerin dayanıklılığını arttıran, zehir etkisini azaltan, ilacın kullanıcıyı uyaran ve kullanımını kolaylaştıran katkı maddesine yardımcı madde denilmektedir.

2.2.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler; formülasyon şekillerine, fiziksel yapılarına, kimyasal özelliklerine, görünüşlerine, zehirlilik derecesine, aktif madde cinsine ve grubuna, hastalık grubu ve etkiledikleri zararlı maddeler ile bunların kullanım tekniklerine ve biyolojik dönemine göre sınıflandırılmaktadır. Sınıflandırılmaları en yaygın kullanılanları, etkili oldukları zararlı grubuna göre ve formülasyon şekillerine göre olanlarıdır. Bu sınıflandırmalardan bazıları şunlardır; Formülasyon şekillerine göre, etki şekillerine göre, kimyasal yapılarına göre, işlevlerine göre, kalıcılıklarına göre, gelişim evrelerine göre sınıflandırılmasıdır. Çizelge 2.1'de pestisitlerin kullandıkları zararlı grubuna göre sınıflandırma gösterilmiştir [33].

Çizelge 2.1. Pestisitlerin Kullanıldıkları Zararlı Grubuna Göre Sınıflandırma

Pestisit Çeşitleri	Etkili Oldukları Zararlı Grubu
İnsektisit	Böcekler
Fungusit	Mantarlar
Akarasit	Örümcekler
Bakterisit	Bakteriler
Herbisit	Yabancı otlar
Mitisit	Keneleri
Larvasit	Larvalar
Afisit	Yaprak bitleri
Rodentisit	Kemirgenler
Nematosit	Solucanlar
Algisit	Algler
Mollussisit	Yumuşakçalar
Repellent	Kaçırıcılar
Auensit	Kuşlar
Ovisit	Yumurtalar
Virisit	Virüsler

A. İnsektisitler

Böcekler üzerinde etkili olan böcek ilacı veya insektisit, bir pestisit grubudur. İnsektisitler, larvasidleri ve ovisidleri içerecek yumurtalar ve larvalar üzerine etkili olmaktadır. Pestisit grubu olan insektisitler, zararlı etkenlere karşı yaygın olarak kullanılan gruptur. İnsektisitlerin daha çok endüstri, tıp ve evlerde kullanılırlar. İnsektisitler, nörotoksikan bir madde olup, sinir sistemi üzerindeki potasyum, sodyum ve membran transportunu, klor iyonları ve spesifik enzimleri baskılayarak veya sinir sistemi uçlarındaki kimyasal nörotransmitter üzerine etki ederek kendini göstermektedir. Böceklerin perifer sinir sistemleri ve merkezi sinir sistemleri fazla gelişmiştir.

İnsektisitlerin, zararlı etki mekanizmaları ve ulaştıkları organlar bütün canlı türlerinde aynı etkiye sahiptir. Ancak zararlı etkilerinin oranı değişebilir ve böcekleri öldürebilmektedirler. Böceklerle mücadelede; piretrinler, organoklorlular ve organofosfatlar, piretroidler ve karbamatlar olarak 4 temel insektisit kullanılmaktadır [33].

B. Fungusitler

İlk kez, 1807'de buğdayın tohumlarından sporları yok etmek için Benedict Prevost, bakır sülfat kullanmış ve bakırın fungusit özellikte olduğunu bulmuştur [33]. Bitkilerde yok olmasına sebep olan bitki hastalıklarının kontrol altına alınıp yok edilmesinde kültürel, biyolojik ve kimyasalların kullanılması gerekli olmuştur. Bitki hastalıklarına karşı genellikle birçok durum etkisiz kalmakta ve bu hastalıklara karşı fungusit denilen kimyasal maddeler kullanılmakta ve hastalıklar kontrol altına alınmaktadır. Fungusitlerin kullanılmasının diğer sebepleri ise düşük dayanıklılık riski, ucuz ve geniş spektrumlu olması ve yüksek uygulama dozudur [33]. Bitkideki organik ve anorganik yapının bozulmasını engelleyen fungusit mantar hastalığını giderirler ve ürünlerin zarar görmesini engellemektedirler. Fungusitlerin bazıları çok zararlıdır ve zehirlenmelere neden olmuştur (civalı fungusitler, Hekzaklorobenzen gibi). Fungusitlerden civa içerenlerin uygulandığı gıdalar, dikkatli kullanılmadığında, nörolojik bozukluklara daha da ileri olarak ölümlere neden olup bu nedenle kullanımına 1970'li yıllarda yasa getirilmiştir.

Kullanımı yaygın olan fungusitler: Civalı bileşikler, Bakır bileşikleri, Ditiyokarbamatlar, Tetrametilthiuram disülfür (thiram), Hekzaklorobenzen'dir.

C. Herbisitler

Pestisitler gurubunda bulunan herbisitler, zararlı olabilecek ve istenmeyen ağaç, bitki gibilerin kontrolde tutulması veya öldürülmesi için kullanılan kimyasallardır. Fakat herbisitlerin yararları gibi zararları da bulunmaktadır. Herbisitler, kontrollü bir şekilde bitkiye uygulanmadığında, zarar veren bitkilerin yanında yararlı olan bitkilerinde zarar görmesine neden olmaktadır.

Bu nedenle bitkilerin fiziksel özelliklerini, biyokimyasal durumlarını, doğal ilerlemesini ve gövde yapısını bozarak bitkinin gelişiminin bozulmasına ya da ölmesine neden olmaktadır.

D. Akarisitler

Akarların yani Mite'lerin etkisi kullanılarak uygulanan kimyasallara akarisitler denir. Avrupa'da Akarasit ilk kez 1959 "Acarosan" adı ile kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'de ise 1989 ve 1991 senelerinde Hatay ve Antalya'da bulunmasına yurt dışından getirilen predatörün sonralarda üretimi yapılmaya başlanmıştır. Akarisitler, yaygın olarak tarımda alanlarında bulunan evlerde koltuk, halı gibi eşyalardaki akarların yumurtalarını ve kendilerini yok etmek ve insanların sağlıklarını bozmamaları amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Çok geniş yayılım alanları olan akarisitler Kırım Kongo Kanamalı Ateşi olarak adlandırılan ve insan sağlığını tehdit eden kene türü ile savaşmak için bir yarar sağlamıştır. Fakat bilinçsiz tüketimde insanları olumsuz etkileyen bir aracı olduğu unutulmamalıdır [34].

2.2.3. Pestisitlerin Kullanımı

Dünyada ki pestisit kullanımı, gıdalara zarar veren böceklerin ve bitkilerin artması ile yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. 1940'lı yıllarda, DDT'nin ilk kez üretime çıkmasıyla kullanılmaya başlanmış olup, 1970'lerde organik fosforların üretilmesiyle pestisit kullanımı yaygın olarak devam etmiştir [35].

Pestisitler, geniş bir alan olarak gıdalardaki hastalıklar, bitkilere zarar veren bitkiler ve tarımdaki zararlılar olarak kullanılır. Ayrıca pestisitler tarım alanı dışında, çimlerde, evlerde, ahşap koruyucu olarak, endüstride, işyerlerinde, halk sağlığında ve hayvansal üretim sürecinde yaygın kullanılmaktadır [36]. Tarım sektöründe yararlarının yanı sıra fabrika ürünlerinde çürüme önleyici ve koruyucu olarak, ev içinde dezenfektan, gıda paketlenmesi, tüketim ürünleri ile ve saklanması pestisitler, bu geniş kullanımları açısından çevredeki canlı dokularda bulunmuştur [36].

Tarımsal ekosistemler, doğal ekosistemi yapay hale getirmiştir. Çünkü insanların üretimi arttırmak istemesi sebebiyle pestisit, gübre gibi doğaya zarar verici maddeler kullanmaya başlamışlardır. Bu nedenle de ekosistem bozulmaya başlamıştır [36].

Ekolojik sisteme bakıldığında tarımda genellikle bir bitki çeşidi kullanıldığından kuvvetsiz ve zayıf bitkilerden oluşur ve böylece bitki popülasyonu oluşur. Gelişen bu ekosistem yüzünden hastalıklı, zararlı, yabancı otlar için ilaç yapmada yapılan ilaçtan sadece %0,015-%0,6 canlı etkilenir ve etkili olur, geride kalan %94-99,9'luk kısım ise diğer canlılara ve toprağa bulaşarak çevreyi etkiler ve çevrenin kirletilmesine, insan sağlığının etkilenmesine neden olmaktadır [36].

Pestisitlerin Çeşitli Kullanım Alanları: Tarımsal üretimde, bahçecilikte, balık yetiştiriciliğinde, bahçeler, parklar ve oyun alanları, kereste ve tütüleme korumacılığı, endüstriyel böcek kontrolünde, inşaat, ev ve bahçelerde, denizlerde böcek kontrolünde, sucul böcek kontrolünde, gıdaların korunmasında, hayvancılıkta, toplum hijyenini sağlamada, böcek kontrolünde, beşeri ilaç olarak kullanılmaktadır.

A. Dünyada Pestisit Kullanımı

Birçok pestisit çeşidi dünya üzerinde kullanılmaktadır, fakat hepsi birbirinden farklı zehirlilik derecelerine sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü, pestisitlerin zehirlilik oranları üzerine yaptığı araştırmada yaygın olarak kullanılan 700 kadar pestisitın 33'nün zararlı olup sağlığı tehdit ettiğini, 48'inin çok fazla zararlı olduğunu, 118'inin orta düzeyde etkili olduğunu ve 239'unun az bir etkiye sahip olduğunu belirterek, insan sağlığına pestisitlerin zarar vererek ölüm tehlikesi yarattığını belirtmiştir. pestisit tüketimi dünyada bakılırsa, %75'i gelişmiş ülkelere aittir ve bu ülkelerin başında ABD, Batı Avrupa ve Japonya gelmektedir.

Zararlı etmenlere karşı dünyada bakıldığında en çok pestisitler içinden %47 oranı ile herbisitlerdir ve %29 ile onu insektisitler, %19 ile de fungusitler izlemektedir. %70'lik pay ile en fazla herbisitler ve insektisitler kullanılmaktadır. Dünyada en çok tarım alanında %25'lik bir oranla ilaç kullanımında en çok meyve ve sebze grubu bulunmaktadır. Hububatlar %15, mısır %11, pamuk %10 gibi oranlarla dikkat çekmektedirler [36].

B. Türkiye’de Pestisit Kullanımı

Türkiye, artan bir nüfusa sahiptir. Bu nedenle artan nüfusa yeterli besin üretimi sağlayabilmesi gerekmektedir. Besin miktarını arttırmak için bitkileri korumak amacıyla çeşitli kimyasallar yani pestisitler kullanılmaya başlanmıştır. Tarım ilacı kullanımına bakıldığında Türkiye’de, ortalama 33.00 ton kadar pestisit kullanımı görülmektedir. %46’sını insektisitler, %25’ini herbisitler, %23’ün fungusitler ve %6’sını da değerleri oluşturmaktadır [37]. Kullanılan ilaçlar bakıldığında %40’nın hububata ve pamuğa, %27’sinin üzüme ve turunçgile, %16’sının ise sebzelerin oluşturduğu görülmüştür ve genellikle insektisitler kullanılmaktadır [35, 37]. Çizelge 2.2’de Türkiye’de 2006-2016 yılları arasında gruplarına göre pestisit kullanımı (ton) gösterilmiştir [38].

Çizelge 2.2. Türkiye’de 2006-2016 yılları arasında gruplarına göre pestisit kullanımı (ton) [38]

Yıllar	İnsektisitler	Fungusitler	Herbisitler	Akarasitler	Diğer	Toplam
2006	7,628	19,900	6,956	902	9,987	45,376
2007	21,046	16,707	6,669	966	3,277	48,716
2008	9,521	17,863	6,177	737	5,613	39,992
2009	9,914	17,396	5,961	1,533	2,302	37,184
2010	7,176	17,546	7,452	1,040	5,344	38,705
2011	6,120	18,124	7,407	1,062	6,978	40,112
2012	7,264	15,525	7,351	859	8,766	40,012
2013	7,741	16,248	7,336	858	7,128	39,439
2014	7,586	16,674	7,794	1,513	6,007	39,722
2015	8,117	15,984	7,825	1,576	5,327	39,026
2016	10,425	20,984	10,025	2,025	6,835	50,054

2.2.4. Pestisitlerin Yayılımı

A. Hava Yoluyla Yayılım

Pestisitler; havaya sis, duman, püskürtme, basınçlı kutulardan püskürtmeyle karışmaktadır. Havaya yayılımları dağılan parçacıkların hacmine, büyüklüğüne, havanın sıcaklığına, hava akımının hızına ve diğer etkenlere bağlı olarak ortam ve ortam dışındaki alanlara yayılır ya da sadece uygulanan ortamda kalmaktadır. Pestisitler uygulanırken insan ve doğayı olumsuz yönde etkilememesi için hava koşulları dikkate alınmalıdır.

Pestisitler insanları daha fazla solunum yoluyla, emilim ve deriden temas ile etkiler, ayrıca suya ve gıdalara karışarak canlıların bünyesine girer ve zarar vermektedirler. Pestisitler kilometrelerce uzaklara havadaki toz zerreciklerine bağlanarak gider ve havada diğer kimyasallarla da etkileşerek daha tehlikeli duruma gelmektedirler. Pestisitlerin insanlara ve çevreye zarar vermemesi için hava koşullarına dikkat edilmeli ve ona göre uygulanma yapılmalıdır [37].

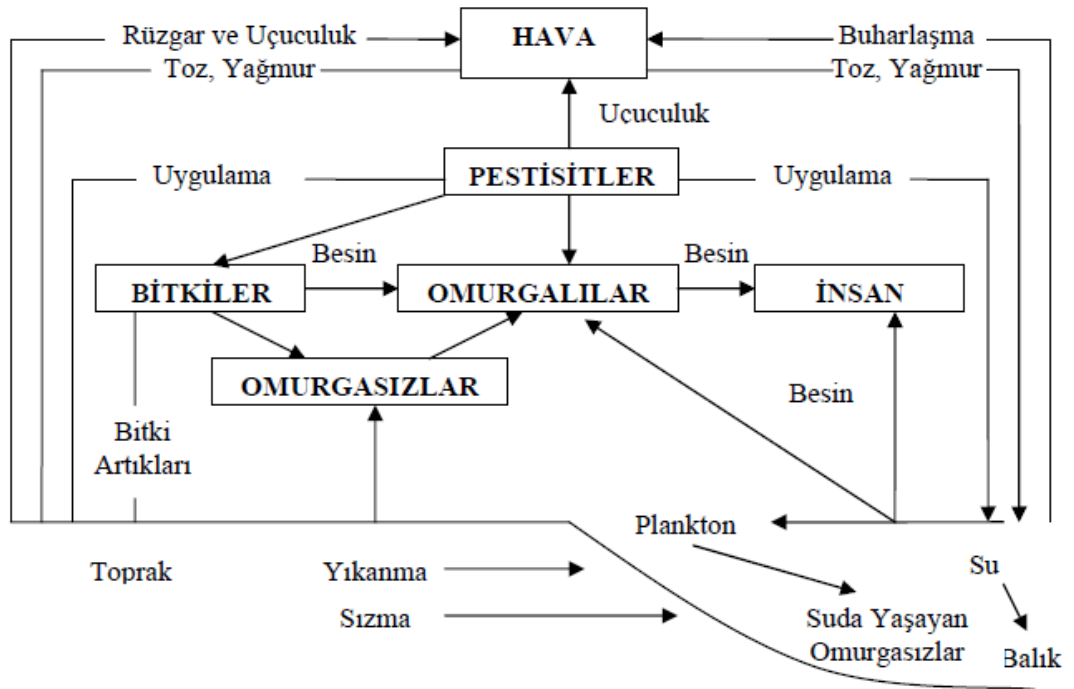
B. Su Yoluyla Yayılımı

Pestisitlerin insan sağlığını tehdit etmesinin bir yoluda uygulanan çeşitli pestisitlerin artan kısmının toprağa geçmesi ve buradan su yolu ile sulama alanlarına karışarak sızıntı ile evdeki sulara karışır ve canlılar ve özellikle insan sağlığı için tehdit oluşturmaktadırlar. Bu yüzden pestisitlerin uygulanması için özellikle denetim gereklidir ve sular araştırılmalı, yoksa kar ve yağmur suları ile toprağa sızarak oradan suyolları ile canlı yaşamını olumsuz etkilemektedirler. Pestisitlerin önemli faydalar sağlamasına karşın kontrolsüz kullanımı su yaşamını olumsuz etkilemektedir. Tarım alanlarında pestisitler ile çalışırken kuyu yanlarında yapılması ve bundan sonrada orada bırakılması sonucunda oradan faydalanan birçok canlı zehirlenir ve ölüme bile neden olabilmektedir [37].

C. Yiyecekler Aracılı ile Yayılmı

Pestisitler taşınır iken yiyecek ve içeceklerle temas halinde olması ve ya depolanması tehlikelidir. Böyle bir durumda ortaya çıkan sonuçta kitlesel etkilenme ve kirlilik meydana gelmektedir. Dünya genelinde pestisitlerin yiyeceklerle tema halde olması veya depolanmasını yasak hale getiren yasalar çıksa dahi evlerde ve özellikle küçük işletmelerde bu yasaklara uyulmayarak içecek ve yiyecek kaplarına pestisitler konuyor ve böylece zehirlenme vakaları ortaya çıkmaktadır.

Pestisitler yiyecek sektöründe insan sağlığını tehdit edecek miktarda değil de daha yeterli miktarda kullanılarak bir zarar etmeni oluşmamaktadır. Fakat yiyeceklerin korunması için bunun daha fazla uygulanmasını düşünen kişilerce bilinçsiz kullanıldığında canlı sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle her türlü alanda pestisit kullanımı denetlenmeli ve aşırı kullananlara karşı önlem alınmalıdır [37]. Şekil 2.2’de pestisitlerin çevredeki sirkülasyonu gösterilmiştir [39].



Şekil 2.2. Pestisitlerin çevredeki sirkülasyonu [39]

2.2.5. Pestisitlerin Bulaşma Yolları

A. Deri Yoluyla Bulaşma

Pestisitler uygulanırken gerekli önlemlerin yapılmaması nedeniyle deri ile temas ederek vücuda girer ve %95 civarında insanlar zehirlenmektedir. Pestisitler deri yolu ile; dökülmesi, sıçraması ile vücut pestisiti emer ve deri ile temas gerçekleşmesi ile oluşmaktadır. Etkilenme hızı, pestisitinin kuvvetli bir kimyasal olup olmamasına, derideki olağan duruma göre değişiklik gösterir ve derideki bir kesik, pestisitinin etki hızını arttırmaktadır. Derinin nemli ya da ıslak olması da etki hızını arttırmaktadır [40].

B. Ağız Yoluyla Bulaşma

Pestisitler ağız yolu ile intihar etmek veya yanlışlıkla alınması ile oluşan zehirlenmedir. Ağız yoluyla bilinçsiz şekilde kullanılarak, etiket uygulanmadan içecek ve yiyecek kaplarına konularak, depolanmasında yiyecek ve içecek kapları kullanılmasıyla pestisitler ağızdan vücuda girerek çeşitli zehirlenmeler oluştururlar [40].

C. Solunum Yoluyla Bulaşma

Pestisitler solunum ile solunarak akciğerlere ulaşırlar ve böylece vücuda alınarak çeşitli zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır. Kimyasal ilaç türlerinde solunum yolu ile vücuda alınanlarında ilaçların partikülleri boğazda birikmekte ve ağızdaki tükürük yolarıyla bulaşmaktadır. Püskürtmenin yoğunluğuna ve yöntemine bağlı olarak bu zararın derecesi değişmektedir. Püskürtülen pestisitinin tanecik boyutu küçük ise büyük olana karşın daha çabuk absorbe edilip insan sağlığı için daha çok zarar vermektedirler [40].

D. Göz Yoluyla Bulaşma

Pestisitlere, vücudun diğer yapılarına karşın gözler daha hassastır. Pestisitler gözlere; dökülme, ellere bulaşması ve oradan göze temas etmesi, sıçrama, uygulamada giyilen giysilerin gözelere temas etmesi sonucu zehirlenmeler gerçekleşmektedir. Gözler, pestisite karşı %100 yanıt gösterir ve böylece ciddi zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır [40].

2.2.6. Pestisitlerin Çevre ve İnsan Üzerine Etkileri

A. Çevre Üzerine Etkileri

Pestisitlerin çoğu çevreye ve insan vücuduna ciddi etki eder ve olumsuz sonuçlar oluşturur. Zarar veren etmene karşı kullanılan pestisitler, sadece uygulanan kıyımda kalmayı bilinçsiz kullanımda etrafındaki yaşamada zarar vermektedir. Pestisitler artık o kadar çok kullanılmaktadır ki, nehirler, yeraltları, göller, tarlalar, denizler pestisit kaynakları haline gelmektedir [41].

Pestisitler, tarımda zarar veren etmenleri ortadan kaldırmak, istenmeyen haşerelere karşı ve zararlı otlara karşı bitkileri korumak amacı ile kullanılsa da, bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı hayvan, insan ve özellikle çevreye çok fazla zarar vermektedir [41]. Ayrıca, omurgasızların ve mikroorganizmaların da yok olmasına neden olan pestisitler, balık, kuş gibi hayvanların, üreme fonksiyonlarını da etkileyerek üremelerini azaltmaktadır. Pestisitler uzun dönemde etki göstererek tür kaybına ve insan sağlığına da ciddi etki gösterirler [37].

B. İnsan Üzerine Etkileri

Pestisitler, kompleks bir organizmaya etki ettiğinde, bu etki biyokimyasal bir toksisite sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkma süreci kısa bir zamanda oluyorsa akut toksisite, uzun bir süreçte gerçekleşiyorsa kronik toksisite denmektedir. Tarımda çiftçilerin bilinçsiz ilaç kullanımı nedeniyle soframızdaki gıdalar gen mutasyonuna, kansere, üreme bozukluklarına, kronik ve akut zehirlenmelere neden olmaktadır.

Pestisitlerin bilinçsiz kullanımı erişkin bireylerde; sindirim kanalı kanserleri, çeşitli beyin tümörleri, testis kanseri, akciğer kanseri, böbrek kanseri, prostat kanseri, tiroid kanseri, lösemi ve meme kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Pestisitlerin, gelişim geriliği, düşüklere ve doğumsal anormallikleri ortaya çıkardığı görülmüştür. Pestisitlere maruz kalan çocuklarda pek çok yan etki görülmüştür [36, 37].

- **Akut Etkiler**

Uzun bir süreç sonucu ortaya çıkmayan etkidir. Tek bir uygulama sonucu etki eder ve insanlar ve hayvanlar tarafından da etkilenilmektedir. Bu etkiler üç başlıkta meydana gelmektedir; Derinin kimyasalla etkileşime geçmesi sonucu dermal toksisite, ortamdaki kimyasalın solunması sonucunda solunumsal toksisite, kimyasalın yiyecekte bulunmasıyla ağız yoluyla alınarak oral toksisite ortaya çıkmaktadır. Akut toksisite genel olarak LC₅₀ (lethal konsantrasyon 50) ve LD₅₀ (lethal doz 50) ile kendini göstermektedir. Ortaya çıkan bu etkilerden astım hastaları çok çabuk etkilenmekte hatta ölümlerine sebep olabilmektedir.

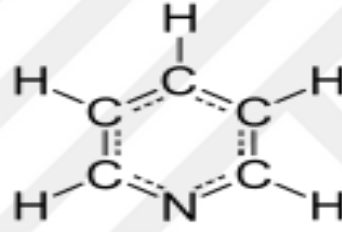
- **Kronik Etkiler**

Uzun bir zaman sürecinde ortaya çıkan, ve tekrarlı alımlarında etki gösteren kronik toksisitedir. Kronik etkiler pestisitlerin etkilemesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunlar; doğum anormallikleri, kanser, nörotoksisite, genetik değişiklikler, nörofizyolojik değişiklikler, nörodavranışsal bozukluklar, fertilité ve üreme üzerindeki etkiler olabilmektedir. Ayrıca bazı pestisitler toksik etki yaratmasa bile mutasyon, kanser, sinir sistemi, immün sistem, endokrin sistem, karaciğer, kalp, kas, kan, boşaltım, nörolojik hasar gibi çeşitli etkilere sebep olabilirler. Pestisitler çeşitli alerjik etkenlere neden olmaktadır.

2.3. Piridin ve Piridin Bileşikleri

Piridin, bazik bir heterosiklik organik bileşiktir. Yapısal olarak benzen ile ilişkilidir. Piridin halkası; vitaminler ve azinler, piridoksin ve niasin dahil olmak üzere birçok önemli bileşikte ortaya çıkmaktadır. Piridin, hoş olmayan bir kokuya sahip renksiz bir sıvıdır. Piridin diğer maddeleri eritmek için kullanılmaktadır. Ayrıca ilaçlar, vitaminler, gıda aromaları, boyalar, boyalar, kauçuk ürünler, yapıştırıcılar, böcek öldürücüler ve herbisitler gibi birçok farklı ürün üretmek için kullanılmaktadır. Piridin ayrıca ortamdaki birçok doğal malzemenin parçalanmasından da oluşabilmektedir. Çizelge 2.3'de piridin kimyasalının moleküler yapısı gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Piridin kimyasalının moleküler yapısı



Piridin, 1849'da İskoç kimyacı Thomas Anderson [42] tarafından kemik yağının bileşenlerinden biri olarak keşfedilmiştir. İki yıl sonra, Anderson petrolün fraksiyonel damıtılması yoluyla saf piridin izole edilmiştir.

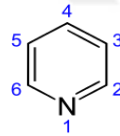
Piridin, agrokimyasallara ve farmasötiklere bir öncü olarak kullanılır ve aynı zamanda önemli bir çözücü ve reaktiftir. İçmek için uygun olmayan hale getirmek için etanole piridin eklenmektedir. DNA'nın *in vitro* sentezinde, sülfapiridin sentezinde (bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı bir ilaç), antihistaminik ilaçlar tripelemin ve mikorraminin yanı sıra su iticiler, bakterisitler ve herbisitler de kullanılmaktadır. Bazı kimyasal bileşikler, piridin'den sentezlenmemiş olsa da, halka yapısını içermektedir. B vitaminleri niasin ve piridoksin, anti-tüberküloz ilaç izoniazid, nikotin ve diğer azot içeren bitki ürünlerini içermektedir. Tarihsel olarak, piridin kömür katranından ve kömür gazlaştırmanın bir yan ürünü olarak üretilmiştir.

Bununla birlikte, piridin için artan talep, asetaldehit ve amonyaktan daha ekonomik sentezleme yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır ve yılda 20,000 tondan fazla üretim dünya çapında üretilmektedir.

Piridin zayıf bazik heteroaromatik bir bileşiktir. Su ve neredeyse tüm organik çözücülerle karışabilmektedir. Hidroklorik asit ile 145-147 °C'de eriyen bir kristal hidroklorür tuzu oluşturmaktadır. Organik reaksiyonlarda, piridin, nitrojen atomunda protonasyon, alkilasyon, asilasyon ve N-oksidasyona uğrayan bir tersiyer amin gibi davranır ve nükleofilik süstitüsyonlar geçiren bir aromatik bileşik olarak bulunmaktadır.

Saf olmayan piridin kuşkusuz, hayvan kemikleri ve diğer organik maddeleri ısıtarak erken simyacılar tarafından hazırlanmıştır, ancak en eski belgelenmiş referans İskoç bilim adamı Thomas Anderson'a atfedilmiştir [42]. 1849'da Anderson [42], hayvan kemikleri yüksek sıcaklıkta ısıtılarak elde edilen yağın içeriğini incelemiştir. Çizelge 2.4'de piridinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.4. Piridinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kimyasal adı	Piridin (C ₅ H ₅ N)
Molekül yapısı	
Molekül ağırlığı, g/mol	79.10 g.mol ⁻¹
Yoğunluğu, g/cm³	0.9819 g/mL
Çözünürlük (20 °C)	100 mg/mL
Erime Noktası, °C	-41.6 °C
Kaynama Noktası, °C	115.2 °C
Kırılma indeksi	1,5093
Viskozite	0,88 cP
Görünüm	Renksiz/Sarımsı

Diğer maddeler arasında, iki yıl sonra saf piridin izole ettiği, hoş olmayan bir kokuya sahip renksiz bir sıvı olan sıvı yağdan ayrılmıştır. Suda çok çözünür olduğunu, konsantre asitlerde ve tuzla ısıtıldığında kolayca çözünür ve sadece yağlarda az çözünür olduğunu açıklamıştır [42].

Çağdaş piridin üretimi yöntemleri düşük bir verim almıştır ve yeni bileşik için artan talep daha verimli yollar aramaya çağırmıştır. Rus kimyacı Aleksei Chichibabin'in, ucuz reaktiflere dayanan bir piridin sentezi reaksiyonunu icat ettiği 1924'te bir atılım olmuştur. Bu yöntem hala piridin endüstriyel üretimi için kullanılmaktadır. Piridin, belladonna (*Atropa belladonna*) ve hatmi (*Althaea officinalis*) yaprak ve kökleri dışında, doğada bol değildir. Bununla birlikte, piridin türevleri genellikle eponymous piridin nükleotidleri ve alkaloidler gibi biyomoleküllerin bir parçasıdır [43].

Günlük hayatta, eser miktarlarda piridin, kavurma ve konserve işlemlerinde üretilen uçucu organik bileşiklerin bileşenleridir, örneğin; kızarmış tavukta, sukiyaki, kavrulmuş kahve, patates cipsi ve kızarmış domuz pastırmasında bulunmaktadır [44]. Piridin izleri Beaufort peynirinde, vajinal sekresyonlarda, siyah çay, gingivitis, ve ayçiçeği balı olanların tükürüklerinde bulunmaktadır.

Tarihsel olarak, piridin, kömür katranından çıkarıldı veya kömür gazlaştırmanın bir yan ürünü olarak elde edilmiştir. Süreç, işgücü tüketen ve verimsizdir: kömür katranı sadece yaklaşık %0,1 oranında piridin içermektedir ve bu nedenle çok aşamalı bir saflaştırma gerekliydi ve bu da çıktıyı daha da düşürmüştür. Günümüzde, çoğu piridin, çeşitli ad reaksiyonları kullanılarak sentetik olarak üretilmektedir ve başlıca olanlar aşağıda tartışılmaktadır. Piridin, dünya çapında 26,000 tonluk 1989 üretimi ile kimya endüstrisinde önemli bir hammaddedir. Piridin için en büyük 25 üretim sahası arasında, onbir Avrupa'da (1999 itibariyle) yer almaktadır.

Piridin ana kullanımı herbisit parakuat ve diquat için bir öncüdür. İnsektisit klorpirifosun ilk sentez adımı, piridin klorlanmasıdır. Piridin, aynı zamanda, piritin-bazlı fungusitlerin hazırlanması için başlangıç bileşimidir. Zincke reaksiyonu ile piridin'den üretilen setilpiridinyum ve laurilpiridinyum, ağız ve diş bakım ürünlerinde antiseptik olarak kullanılmaktadır. Piridin N-alkilpiridinyum tuzları vermek üzere alkilleyici maddeler tarafından kolaylıkla saldırıya uğramaktadır.

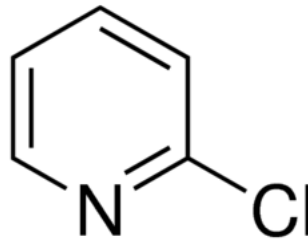
Solunduğunda, yutulduğunda ya da ciltten emilirse piridin zararlıdır. Olası bir kanserojen madde olarak değerlendirmeler, hayvanlarda karsinojenik etki olduğuna dair sınırlı kanıt olmasına rağmen, insanlarda piridin karsinojenisitesi için yetersiz kanıt olduğunu göstermiştir. Mevcut veriler, içme suyundaki piridin maruziyetinin, farelerde tüm doz seviyelerinde sperm hareketliliğinin azalmasına ve sıçanlarda en yüksek doz seviyesinde artan östrus döngüsü uzunluğuna yol açtığını göstermektedir.

2.3.1. 2-Kloropiridin

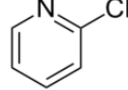
İnsanlar için sağlık tehlikesi oluşturan genotoksik maddeler, çevredeki çeşitli organizmaları da etkileri altına alabilmektedirler. Piridin ve piridin türevleri, potansiyel çevresel ve sağlık tehditleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Tarımda insektisitler ve herbisitler olarak yaygın olarak kullanılmaları ve farmasötik ve tekstil üretimi ve kimyasal sentezle ilişkili endüstriyel faaliyetler yoluyla çevreye girebilirler [45-47]. Bu tür pestisitlerin ve kentsel, endüstriyel atıkların yaygın kullanımı ile sonuçlanabilir. Uygulama ve boşaltma bölgeleri etrafındaki yüzey ve yer altı sularının kirlenmesi buna bir örnektir. Bu bileşiklerin doğal olarak meydana gelen fizikokimyasal ve/veya biyolojik süreçler yoluyla bozunması, su ortamlarında önemli düzeyde piridin ve piridin türevlerine neden olabilmektedir [48, 49].

2-KP, doğal olarak meydana geldiği bildirilmemişse de, özellikle bir çevresel kirletici olarak rapor edilmiştir. Çizelge 2.5’de 2-KP kimyasalının moleküler yapısı verilmiştir. 2-KP, kozmetiklerde ve çeşitli farmasötik ürünlerinde kullanılmak üzere pirition bazlı biyositlerin üretiminde anahtar bir ara ürün olarak ortaya çıkmaktadırlar. Çizelge 2.6’da 2-KP’nin kimyasal ve fiziksel bazı özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.5. 2-KP kimyasalının moleküler yapısı



Çizelge 2.6. 2-KP'nin kimyasal ve fiziksel bazı özellikleri

Kimyasal adı	2-Kloropiridin (C ₅ H ₄ ClN)
Molekül yapısı	
Molekül ağırlığı, g/mol	113.54
Yoğunluğu, g/mL (20 °C)	1.2 g / mL
Erime Sıcaklığı, °C	-46 °C
Kaynama Sıcaklığı, °C	166 °C
Çözünürlük	27 g / L
Asitlik (pKa)	0.49
Görünüm	Renksiz/Sıvı form

Su ortamı günlük olarak önemli miktarda farmasötik, zirai kimyasal ve kozmetik endüstrisi kimyasallarını kabul etmektedir. 2-KP, su ortamına farklı yollardan, sanayi birimlerinin atıklarında bulunan bileşikler olarak, tesadüfen çevreye salınan bileşikler olarak, insan veya hayvan vücudu tarafından uygulanan ilaçların metabolik ürünleri olarak ya da spesifik pestisitleri metabolize eden veya içermeyen bitkiler ile ulaşabilmektedir. Bu kimyasallar veya bunların birincil metabolitleri genellikle kalıcı bileşiklerdir. İstenmeyen kirletici olmanın yanı sıra, çevrede birikimleri, ilgili farmasötiklere/zirai ilaçlara dirençli olan varlıkların gelişmesine katkıda bulunur ve böylece etkililiklerini azaltmaktadır [45-51].

2-KP pestisitler, kozmetikler ve diğer farmasötik ürünlerin üretiminde ortaya çıkan önemli bir ara üründür. Bu çoğunlukla antropojenik kökenli bir kirleticidir. Endüstriyel atıksularda, bir nehir kirletici ve tarımsal kimyasal ürünlerden oluşan bir metabolit olarak iz organik kimyasal olarak tanımlanmıştır [52]. Ayrıca, imidacloprid gibi spesifik insektisitlerin ayrışması sırasında ikincil bir kirletici olarak oluşturulmuş gibi görünmektedir. Memelilerde, bitkilerde ve böceklerde tanımlanan tüm ana imidakloprid metabolitleri 2-KP kısmını içermektedir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1 Mitoz Bölünme

Hücre biyolojisinde mitoz, kopyalanmış kromozomların iki yeni çekirdeğe ayrılmasıdır. Hücre bölünmesinde, kromozom sayısı muhafaza edilir ve genetik olarak aynı hücrelerin oluşmaktadır. Genel olarak, mitoz (çekirdeğin bölünmesi), S fazı (DNA'nın replike edildiği) aşamasından sonra hücrenin bölünmesini sitokinez takip eder. Mitoz ve sitokinez birlikte, bir hayvan hücre döngüsünün mitotik (M) fazını yani ana hücrenin birbiriyle genetik olarak özdeş iki yavru hücresine bölünmesini oluşturmaktadır.

Mitoz süreci, bir dizi aktivitenin tamamlanmasına ve sonrakilerin başlangıcına karşılık gelen aşamalara ayrılır. Bu aşamalar profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofazdır. Mitoz sırasında, kromozomlar, daha önce kopyalanmış, yoğunlaşan ve her bir kromozomun bir kopyasını hücrenin karşıt taraflarına çeken iğ fiberlerine bağlanmaktadır. Sonuç olarak genetik olarak aynı iki çekirdek oluşmaktadır. Hücrenin geri kalanı daha sonra iki kardeş hücre üretmek için sitokinez ile bölünmeye devam etmektedir [53]. Normalde iki hücre yerine üç veya daha fazla sayıda yavru hücrenin üretilmesi, tripolar mitoz veya multipolar mitoz (doğrudan hücre triplikasyon/çoğalma) olarak adlandırılan mitotik bir hatadır [54]. Mitoz sırasında diğer hatalar apoptozu (programlanmış hücre ölümü) indükleyebilir veya mutasyonlara neden olabilmektedir. Bazı mutasyon türleri bu tür hatalardan kaynaklanabilmektedir [55].

Mitoz sadece ökaryotik hücrelerde görülmektedir. Çekirdeksiz prokaryotik hücreler, ikili fizyon olarak adlandırılan farklı bir süreçle bölünmektedir. Mitoz organizmalar arasında değişmektedir. Örneğin, hayvan hücreleri, kromozomlar birbirinden ayrılmadan önce nükleer zarın parçalandığı bir mitozdan geçerken, mantarlar farklı bir mitozu uğrarlar, burada kromozomlar sağlam bir hücre çekirdeği içinde bölünmektedir [56].

Çoğu hayvan hücresi, mitoz başlangıcında yakın bir küresel morfolojiyi benimsemek için mitotik hücre yuvarlaması olarak bilinen bir şekil değişikliğine uğramaktadır. Çoğu insan hücresi mitotik hücre bölünmesi ile üretilmektedir. Önemli istisnalar mayoz ile üretilen spermler ve yumurta hücreleridir.

3.1.1. Mitoza Genel Bakış

Mitoz ve sitokinezin birincil sonucu, bir ana hücrenin genomunun iki yavru hücresine aktarılmasıdır. Genom, doğru hücre fonksiyonu için hayati öneme sahip genetik bilgi içeren sıkı bir şekilde sarılmış DNA komplekslerinden oluşan bir dizi kromozomdan oluşmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan her hücre, ana hücreye genetik olarak özdeş olması gerektiğinden, ana hücre mitozdan önce her bir kromozomun bir kopyasını almalıdır. Bu, interfazın S fazı sırasında ortaya çıkmaktadır. Kromozom çoğalması, sentromerdeki kinetokor proteinleri tarafından birbirine bağlanan iki özdeş kardeş kromatid ile sonuçlanmaktadır.

Mitoz başladığında, kromozomlar yoğunlaşır ve görünür hale gelmektedir. Bazı ökaryotlarda, örneğin hayvanlar, DNA'yı sitoplazmadan ayıran nükleer zarf, küçük kesecikler halinde parçalanır. Hücrede ribozom yapan nükleolus da kaybolmaktadır. Hücrenin zıt uçlarından mikrotübüller, sentromerlere yapışır ve kromozomları hücre içinde merkezi olarak hizalamaktadır. Mikrotübüller daha sonra her bir kromozomun kardeş kromatitlerini birbirinden ayırmak için kutuplara çekilirler [57]. Bu noktada kromatidlere kardeş kromozomlar denir. Hücre uzadıkça, karşılık gelen kardeş kromozomları hücrenin karşıt uçlarına doğru çekilir ve geç anafazda maksimum yoğunlaşırlar. Ayrılmış kardeş kromozomlar etrafında yeni bir nükleer zarf oluşturur ve bu da anafaz çekirdeklerini oluşturmak üzere ayrışmaktadır.

Mitotik progresyon sırasında, tipik olarak anafaz başlangıcından sonra, hücre sitokineze geçebilmektedir. Hayvan hücrelerinde, bir hücre zarı iki yeni hücre üretmek için iki gelişmekte olan çekirdek arasında içe doğru uzanmaktadır. Bitki hücrelerinde, iki çekirdek arasında bir hücre plakası oluşmaktadır. Sitokinez her zaman gerçekleşmez; koenositik (birçok çekirdekli durum tipi) hücreler, sitokinez olmaksızın mitozla maruz kalmaktadır.

3.1.2. Mitoz Bölünme Nedenleri

A) Gelişim ve büyüme

Bir organizma içindeki hücre sayısı, mitoz ile artmaktadır. Bu, tek hücreli, yani zigot ve çok hücreli bir vücudun büyümesinin temelini oluşturan çok hücreli bir gövdenin gelişiminin temelidir.

B) Hücre değişimi

Vücudun bazı bölümlerinde, örneğin cilt ve sindirim sistemi, hücreler sürekli olarak dışarı atılır ve yenileriyle değiştirilir. Yeni hücreler mitoz ile oluşur ve bu yüzden değiştirilen hücrelerin tam kopyaları vardır. Benzer şekilde kırmızı kan hücrelerinin kısa ömrü (yaklaşık 4 ay) vardır ve yeni kan hücreleri mitoz ile oluşmaktadır.

C) Yenilenme

Bazı organizmalar vücut kısımlarını yeniden üretebilir. Bu gibi durumlarda yeni hücrelerin üretimi mitoz ile sağlanmaktadır. Örneğin, denizyıldızı, mitoz yoluyla kayıp kollarını yeniden canlandırır.

D) Eşsüz üreme

Bazı organizmalar, aseksüel üreme yoluyla genetik olarak benzer yavrular üretmektedirler. Örneğin, hydra, tomurcuklanarak aseksüel olarak çoğalır. Hidra yüzeyindeki hücreler mitozla uğrar ve tomurcuk denen bir kütle oluşturur. Mitoz tomurcuk hücrelerinde devam eder ve bu yeni bir birey haline gelir. Aynı bölünme, aseksüel üreme veya bitkilerde bitkisel yayılma sırasında gerçekleşir.

3.1.3. İnterfaz

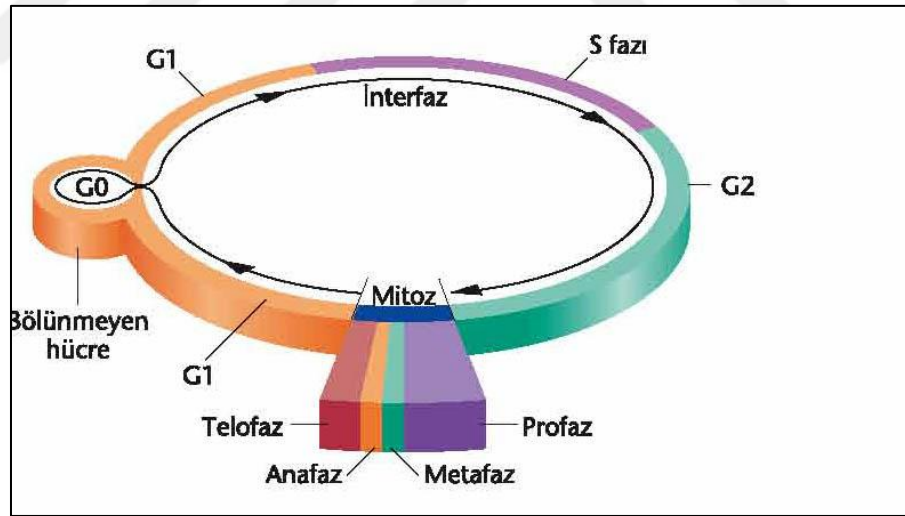
Mitotik faz, hücre döngüsünün nispeten kısa bir periyodudur. Hücrenin hücre bölünmesi süreci için kendini hazırladığı çok daha uzun aralıklarla değişmektedir. İnterfaz üç aşamaya ayrılır: G₁ (ilk faz), S (sentez) ve G₂ (ikinci faz). Üç bölümden oluşan interfaz boyunca, hücre proteinler ve sitoplazmik organeller üreterek büyümektedir. Bununla birlikte, kromozomlar sadece S fazı sırasında çoğaltılır. Böylece, bir hücre büyüdükçe (G₁), kromozomlarını (S) kopyaladığı, daha fazla büyüdüğü ve mitoz (G₂) için hazırlandığı ve son olarak döngüyü yeniden başlatmadan önce (M) ayrıldığı için büyümeye devam etmektedir [57]. Şekil 3.1’de hücre siklusu gösterilmiştir [58].

Organellerin ve ribozomlar miktarı iki katına çıktığı; **G₁ Evresi**

Organellerin iki katına çıkarılması devam ederken DNA sentezinin gerçekleştiği; **S Evresi**

Hücrenin mitozla hazırlandığı evre; **G₂ Evresi**

Mitoz ve sitoplazma bölünmesinin (sitokinez) gerçekleştiği evre; **M Evresi**’dir.



Şekil 3.1. Hücre siklusu [58]

Hücre döngüsündeki tüm bu fazlar, siklinler, sikline bağımlı kinazlar ve diğer hücre döngüsü proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Fazlar sıkı bir düzende birbirini takip eder ve hücre işaretlerini bir fazdan diğerine iletirmek için "kontrol noktaları" vardır.

Hücreler ayrıca geçici olarak veya kalıcı olarak hücre döngüsünü terk edebilir ve bölünmeyi durdurmak için G_0 fazına girebilmektedir. Bu, hücrelerin aşırı kalabalıklaştığında (yoğunluk-bağımlı inhibisyon) veya insan kalp kas hücreleri ve nöronlar için olduğu gibi organizma için spesifik işlevleri yerine getirmek üzere farklılaştıklarında ortaya çıkabilmektedir [57]. Şekil 3.2’de hücre döngüsü kontrol noktaları gösterilmiştir [59]. Bazı G_0 hücreleri hücre döngüsüne yeniden girme kabiliyetine sahiptir. Hücre döngüsü kontrol noktaları aşağıdaki gibidir;

G_1 kontrol noktası :

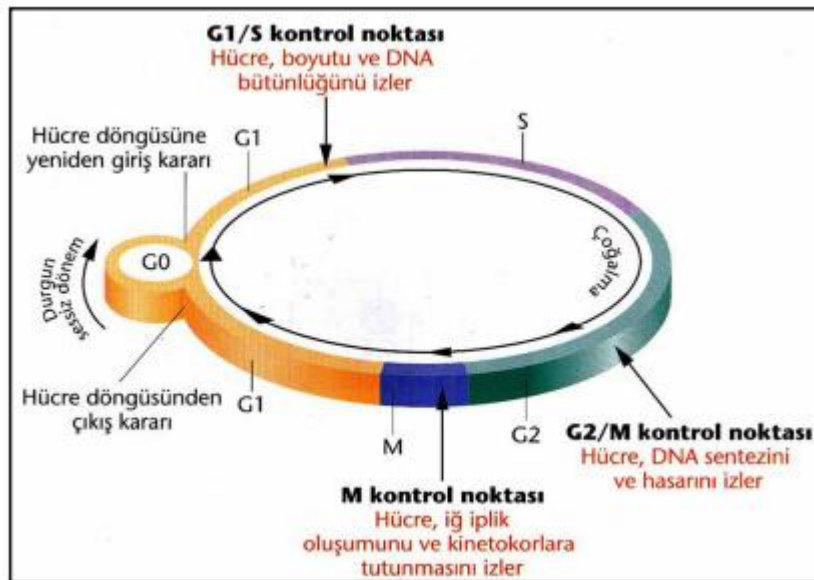
- Hücrenin yeterli büyüklüğe ulaşmış ya da ulaşmamış olmasını kontrol eder.
- Hücre içerisinde yeterli besin olup olmadığını kontrol eder.
- DNA’nın hasar görüp görmediğini kontrol eder.

G_2 kontrol noktası :

- Replike olmamış ve hasarlı DNA’yı kontrol eder.
- Hücrenin büyüklüğünü kontrol eder.

M kontrol noktası :

- İğ ipliği oluşumunda kontrol noktası yani kromozomların mitotik ipliklere düzgün tutunamamasını kontrol eder.

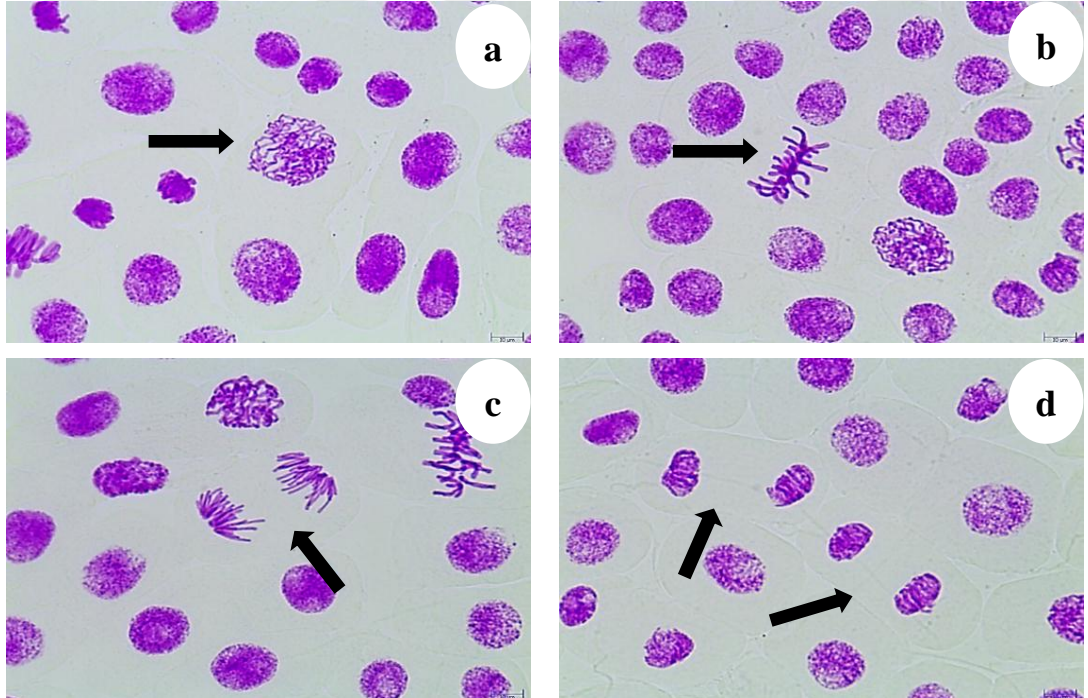


Şekil 3.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları [59]

3.1.4. Mitoz Bölünme Aşamaları

A. Preprofaz (Bitki hücreleri)

Bitki hücrelerinde, öncül bir ön-faz aşaması vardır. Yüksek dereceli bitki hücrelerinde, mitoz başlamadan önce çekirdeğin hücrenin merkezine göç etmesi gerekmektedir. Bu, hücre bölünmesinin gelecekteki düzlemi boyunca hücreyi ikiye ayıran çapraz bir sitoplazma tabakası olan bir fragmozom'un oluşturulmasıyla elde edilmektedir. Fragmozom formasyonuna ek olarak preprofaz, gelecekteki mitotik evrenin ekvatorial düzlemi etrafındaki plazma zarının altında bir mikrotübül ve aktin filamentler (preprofaz bandı olarak adlandırılır) halkasının oluşumu ile karakterize edilir. Bu bant, hücrenin bölüneceği konumu işaretlemektedir. Daha yüksek bitkilerin (çiçekli bitkiler gibi) hücreleri, sentriolden yoksundur; bunun yerine, mikrotübüller çekirdeğin yüzeyi üzerinde bir mil oluşturur ve daha sonra nükleer zarfın parçalanmasından sonra, kromozomların kendileri tarafından bir iğle düzenlenir [57] Nükleer zarfın çökmesi ve prometafaz da iğ oluşumu sırasında preprofaz bandı kaybolmaktadır.



Resim 3.1. *A. cepa*'da Mitoz bölünme safhaları
a: Profaz, b: Metafaz c: Anafaz d: Telofaz

B. Profaz

G_2 interfazından sonra ortaya çıkan profaz sırasında, hücre kromozomlarını sıkı bir şekilde yoğunlaştırarak ve mitotik iğ formasyonu başlatarak bölünmeye hazırlanır. İnterfaz sırasında, çekirdekteki genetik materyal gevşek bir şekilde paketlenmiş kromatin içermektedir. Profazın başlangıcında, kromatin lifleri tipik olarak ışık mikroskobu ile yüksek büyütmede görülebilen ayrı kromozomlara yoğunlaşır. Bu aşamada, kromozomlar uzun, ince ve iplik benzeridir. Her kromozomun iki kromatidi vardır. İki kromatid de sentromere katılırlar. Gen transkripsiyonu profaz sırasında durur ve geç anafaz erken G_1 fazına kadar devam etmemektedir [60-62]. Nükleus da erken profazda kaybolmaktadır (Resim 3.1a).

Hayvan hücrelerinin çekirdeğine yakın, gevşek bir protein toplanmasıyla çevrelenmiş bir çift yapıdan oluşan sentrozom adı verilen yapılar vardır. Sentrozom, hücrenin mikrotübülleri için koordinasyon merkezidir. Bir hücre, hücre bölünmesindeki tek bir sentrozomu alır; bu, yeni bir mitoz turunun başlamasından önce hücre tarafından kopyalanır ve bir çift sentrozom vermektedir. İki sentrozom, mikrotübül mili aparatı oluşturmaya yardımcı olmak üzere tübülünü polimerize ederler. Motor proteinleri daha sonra bu mikrotübüller boyunca sentrozomları hücrenin karşıt taraflarına itmektir. Sentrozomlar mikrotübül düzeneğini düzenlemeye yardım etse de, iğsi kısmının oluşumu için gerekli değildir, çünkü bitkilerde bulunmamaktadır [57] ve hayvan hücresi mitozu için kesinlikle gerekli değildirler [63].

C. Prometafaz

Hayvan hücrelerinde prometafazın başlangıcında, nükleer laminlerin fosforilasyonu nükleer zarfın küçük zar keseciklerine ayrışmasına neden olmaktadır. Bu olduğu gibi, mikrotüp nükleer alanı istila etmektedir. Buna açık mitoz denir ve bazı çok hücreli organizmalarda görülür. [64, 65].

Geç prometafazda kinetokor mikrotübüller, kromozomal kinetokoroları eklemeye başlamaktadır. Kinetokor, geç profaz sırasında kromozomal sentromer üzerinde oluşan bir proteinli mikrotübül bağlayıcı yapıdır [66, 67].

Bir dizi polar mikrotübül, mitotik mili oluşturmak için karşılık gelen cisimciklerden gelen polar mikrotübülleri bulup etkileşmektedir [68]. Kinetokor yapısı ve işlevi tam olarak anlaşılmamış olsa da, bir çeşit moleküler motor içerdiği bilinmektedir [69]. Bir mikrotübül kinetokor ile birleştiğinde, ATP'den gelen enerjiyi kullanarak, tüpten çıkan sentrozoma doğru harekete geçmektedir. Bu motor aktivitesi, polimerizasyon ve mikrotübüllerin depolimerizasyonu ile birleştiğinde, daha sonra kromozomun iki kromatidini ayırmak için gerekli olan çekme kuvvetini sağlamaktadır [69].

D. Metafaz

Mikrotübüller prometafazda kinetokorlara yerleştirildikten ve bağlandıktan sonra, iki sentrozom, kromozomları hücrenin karşıt uçlarına doğru çekmeye başlamaktadır. Ortaya çıkan gerilim kromozomların metafaz plakası veya ekvatorial düzlem boyunca hizalanmasına neden olur; bu, iki kromozom arasında (hücrenin yaklaşık orta çizgisinde) yer alan hayali bir çizgidir [69]. Mitoz sonunda kromozomların eşit dağılımını sağlamak için metafaz kontrol noktası, kinetokorların mitotik iğlere düzgün bir şekilde bağlandığını ve kromozomların metafaz plakası boyunca hizalandığını garanti etmektedir [70]. Hücre metafaz kontrol noktasından başarılı bir şekilde geçerse, anafaza geçmektedir (Resim 3.1b).

E. Anafaz

Anafaz A sırasında, kardeş kromatidleri birbirine bağlayan kohezinler, iki özdeş kardeş kromozom oluştururlar [71]. Kinetokor mikrotübüllerin kısaltılması, yeni oluşan kızı kromozomları hücrenin zıt uçlarına çekmektedir. Anafaz B sırasında, polar mikrotübüller birbirlerine doğru iterek, hücrenin uzamasına neden olmaktadır. Geç anafazda, kromozomlar ayrıca, kromozom ayrışmasına ve çekirdeğin yeniden oluşumuna yardımcı olmak için genel maksimum yoğunlaşma seviyelerine ulaşırlar (Resim 3.1c). Çoğu hayvan hücrelerinde, anafaz A, anafaz B'den önce gelir, ancak bazı omurgalı yumurta hücreleri, olayların tersini göstermektedir [71].

F. Telofaz

Telofaz, profaz ve prometafaz olaylarının tersine çevrilmesidir. Telofazda, polar mikrotübüllerin uzatılması, hücrenin daha da uzaması devam etmektedir. Eğer nükleer zarf parçalanmışsa, ana hücrenin eski nükleer zarfının zar veziküllerini kullanarak yeni bir nükleer zarf oluşur. Yeni zarf, her bir ayrılmış kardeş kromozom kümesini oluşturur (zarf sentezlerini kaplamamasına rağmen) ve nükleolus yeniden ortaya çıkmaktadır. Her ikisi de yeni nükleer membranla çevrili olan kromozom setleri "gevşemeye" veya ayrışmaya başlar. Mitoz tamamlanır. Her bir hücrenin çekirdeği aynı kromozom setine sahiptir (Resim 3.1d).

G. Sitokinez

Sitokinez, mitoz evresi değil, hücre bölünmesinin tamamlanması için gerekli olan ayrı bir süreçtir. Hayvan hücrelerinde, bir kasılma halkası içeren bölünme, metafaz plakasının eskiden ayrılmış çekirdeği ayırdığı yerde gelişmektedir [72]. Hücre bölünmesi, hem hayvan hem de bitki hücrelerinde de, hücrenin ortasına mikrotübüller boyunca hareket eden Golgi aygıtından türetilen kesecikler tarafından yönlendirilir [73]. Bitkilerde, bu yapı fragmoplastın merkezinde bir hücre plakasıyla birleşir ve iki çekirdeği ayıran bir hücre duvarına dönüşmektedir. Fragmoplast, daha yüksek bitkiler için tipik bir mikrotübül yapısıdır, bazı yeşil algler ise sitokinez sırasında bir fikoplast mikrotübül dizisi kullanılır. Her hücre, ana hücrenin genomunun tam bir kopyasına sahiptir. Sitokinezin sonu M fazının sonunu işaret etmektedir.

Mitoz ve sitokinezin ayrı ayrı meydana geldiği, birden fazla çekirdeğe sahip tek hücreler oluşturan birçok hücre vardır. Bunun en dikkate değer olanları mantarlar, balçık kalıpları ve koenositik alglerdir, ancak diğer çeşitli organizmalarda da bulunur [74].

3.2. Mutasyonlar

Genetik bilginin, sağlıklı bir şekilde nesillere aktarılmasında, DNA'nın yapısının korunması oldukça önemlidir. DNA üzerinde bulunan bazlardaki polar grupları fonksiyonu belirlemektedir. Polar gruplarda ki spesifik hidrojen bağları, çift sarmal yapıdaki DNA'yı oluşturmaktadır. DNA üzerindeki bazların polar gruplarındaki çeşitli kimyasal değişimler, replikasyon işlemi sırasında bazların yanlış eşleşmesine ve bunun sonucunda mutasyona sebep olmaktadır. DNA'yı oluşturan iskelette oluşan çeşitli hasarlar ve kopmalar, replikasyon sürecini durdurabilir ve bu hasarlar çok fazla olduğunda hücrenin ölmesine neden olmaktadır.

DNA'mızda her gün yaklaşık 104 tane yanlış kodlanmaya yol açan ya da kodlanamayan çeşitli hasarlar meydana gelmektedir [75]. DNA'da oluşan bu hasarları tamir etmek yani onarmak için birçok spesifik tamir mekanizmaları bulunmaktadır. Eğer, DNA tamir mekanizmalarının yetersiz kaldığı ya da tamir mekanizmalarının bir mutasyon sonucu hasara uğramasıyla DNA'nı birleşiminde ve miktarında değişiklikler, transkripsiyon-protein sentezi durmasına, replikasyon sürecinin durmasına, uzun hasar varlığında ise kromozom hasarlarına ve mutasyona neden olmaktadır [76]. Oluşan hasar onarılabilecek durumda ise tamir mekanizmaları tarafından onarılır. DNA'da oluşan hasarlar çok ağır ise hücre apoptotik yola girerek kontrollü ölümünü gerçekleştirir. Orta seviyedeki hasarlar mutasyon oluşmasına neden olmaktadır. DNA hasarı, çevre faktörleri ile ya da canlının kendisinden kaynaklanabilmektedir. DNA hasarında bazların yapısı kendiliğinden değişerek, pirimidin ve pürin bazlarının yerleri değişerek, yanlış eşleşme denilen yapılara sebep olabilmektedir. Baz kaybı yaşanarak da apirimidik ve apürinik bölgeler oluşmaktadır. Bu kayıplar replikasyonu etkilemektedir [75].

DNA hasarına neden olan çevresel faktörler, kimyasal ve fiziksel ajanlardır. Fiziksel ajanlarda en çok radyasyon gelmektedir. Radyasyonun etkisi ile sarmal üzerinde zincir kırıkları ve baz değişimleri meydana gelebilmektedir. UV ışınları ise pirimidin dimerleri oluşumuna, çapraz bağlanmalara ve zincir kırıklarına yol açmaktadır. Kimyasal ajanların başında ise nitroz asid, alkilleyici maddeler, fenitoin ve aflatoksinler gelmektedir. Bu kimyasallar, bazları oksitleyerek, alkilleyerek, çapraz bağlanmalar yaparak, zincir kırıklarına neden olarak DNA'da hasar oluştururlar [77]. Çizelge 3.1.'de mutasyonlara sebep olan bazı endojen ve ekzojen etkenler gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Mutasyonlara sebep olan bazı endojen ve ekzojen etkenler

Endojen (spontan) Etkenler	Ekzojen (evresel) Etkenler
Yanlış eşleşmeler: İnsersiyon/delesyonlar	Kimyasal ajanlar: Vinil klorid, benzopren, kemoterapi ilaçları, mustard gazları, aflotoksin, alkilleyici ajanlar v.b
Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon	
Baz kayıpları: Depurinasyon/depirimidinasyon	Fiziksel ajanlar: İyonize radyasyon, UV radyasyon v.b
Oksidatif hasar: 100,000 /h.cre/g.n	
Replikasyon hataları	

3.2.1. Mutajenler

Mutasyona sebep olan bütün maddelere mutajen denir. Mutajenler, DNA'nın yapısına girerek değişime uğratırlar. Temel olarak üçe ayrılırlar; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere sınıflandırılabilir [77].

A. Fiziksel Mutajenler

Fiziksel mutajenler, etki ettikleri sürece ve şiddetine bağlı olarak geçici ya da kalıcı olabilmektedirler. Bu etmenler; sıcaklık, elektriksel alan, manyetik alan, X, UV, nötron ve proton ışınları gibi etkenlerdir. Bu mutajenler genellikle baz çiftlerini değiştirmektedir.

B. Biyolojik Mutajenler

Biyolojik mutajenler, genel olarak transpozibil elementler ve virüsler görülmektedir. Virüs, bir konak hücreye girdiğinde, kendi DNA'sından bir kısmı konak DNA'sına geçirdiğinden mutajen olarak kabul edilirler. Transpozibil elementler, DNA üzerinde bulunduğu yerden başka yere hareket ederek genetiksel yapı üzerinde değişikliğe neden olmaktadır.

C. Kimyasal Mutajenler

- **Baz Analogları**

Bu yapılar, bazların yerine geçerek onlarla aynı fonksiyonu yapmakta olan ancak kimyasal olarak farklı ajanlardır. Bu ajanların molekül yapıları DNA üzerinde bulunan bazlara oldukça fazla benzediğinden, kötü etkilerini DNA sentezi yani replikasyon sırasında yapıya katılması gereken bazların yerine geçerek DNA'nın yapısını bozarak göstermektedirler. Bu nedenle replikasyon süreci bittiğinde birçok yanlış eşleşmiş baz bulunmaktadır [77].

- **DNA'da Baz Değiştiren-Baz Ekleyen Maddeler**

DNA'da baz değiştiren maddeler, DNA yapısına katılarak bazları değiştirirler. Bunların içinden en önemli olanı nitröz asididir. Bu madde DNA'daki amino gruplarına etki ederek çıkarır ya da bazların sıralarında değişiklik yapmaktadırlar. Baz değişimi sonucunda, bazlar çok farklı bir yapıya dönebilirler. Bu dönüşümle, replikasyon sırasında yanlış eşleşme oluşarak genetik kodda da değişikliğe neden olmaktadır.

DNA'ya baz ekleyen maddeler ise alkilleyici ajanlardır. Bu ajanlar pürin bazı olan guaninin 7. Atomuna bir alkil grubu eklerler ve yapı değişimine neden olmaktadır. Bunun sonucunda pürin bazı DNA yapısından ayrılmaktadır. Alkilenen guanin bazı, DNA zincirinden tamamen kopabilir ve böylece replikasyon sırasında kopan yere farklı bir baz bağlanabilmektedir [77].

- **Akridin Boyalar**

Akridin boyalar yanlış eşleşmelere genellikle neden olabilmektedirler. Bu boyalar her zaman genin fonksiyonunun kaybolmasına sebep olurlar. DNA yapısında delesyon veya inversiyon meydana getirebilmektedirler. Akridin boylarının DNA üzerindeki mutasyon yerleri belirsiz bir şekilde dağılmıştır ve bu yerlere “sıcak noktalar (hot spots)” denilmektedir [77].

3.2.2. Gen Mutasyonları

Mutasyonlar gen düzeyinde veya kromozomal düzeyde olmaktadır. Gen düzeyinde değişimler baz eklenmesi-çıkması, değişimi, baz çiftinin ters dönmesi veya başka bir yere transferi olarak ele alınabilir. Gelişmiş ve çok hücreli canlılarda, mutasyon yani hasar somatik hücrelerde oluşmuşsa sadece oluşan bireyi etkilemektedir. Bu mutasyon tipine somatik mutasyon denilmektedir. Fakat oluşan mutasyon canlıların eşey hücrelerinde oluşursa döller aracılığıyla nesilden nesile aktarılabilir. Bu mutasyonlar eşey hücresi mutasyonları olarak adlandırılmaktadır.

Eşeysiz olarak üreyebilen çok hücreli canlılarda, somatik mutasyonlar yeni nesile aktarılabilir. Prokaryotlarda, eşey veya vücut hücresi ayrımı olmadığı için oluşan her türlü mutasyon yeni nesillere aktarılabilir. Eğer mutasyon bir gen içerisindeki değişim ise gen mutasyonları denilmektedir. Mutasyonlar ya kendiliğinden meydana gelebilir ya da mutajenler denilen maddeler de uygulanarak mutasyonların oluşması da sağlanabilir.

Mutajenlerin etki etmesi ile oluşan mutasyonlara uyarılmış mutasyonlar denilmektedir. Kendiliğinden oluşan mutasyonlara ise doğal mutasyonlar denilmektedir. Kendiliğinden veya uyarılmış olarak adlandırılan mutasyonları her zaman kesin bir çizgi ile ayırmak mümkün değildir [77].

A. Baz Değişimi Mutasyonları

DNA üzerindeki bir gen bölgesinde bulunan bazın başka bir baz ile yer değiştirmesine baz değişimi mutasyonları denilmektedir. Eğer primidin-primidin ya da pürin-pürin bazı yer değiştirmesi görülüyorsa transisyon (karşılıklı geçiş) mutasyonu; pürin-primidin yer değiştirmesi ise transversiyon (çapraz geçiş) mutasyonu olarak adlandırılmaktadır. Gen yapılarında meydana gelen bu değişimler aminoasit değişikliğine neden olarak ciddi sorunlara neden olabilmektedir.

DNA üzerinde oluşan bütün hasarlara ve değişikliklere mutasyon denilse de, fenotipik bir etki oluşturmeyen mutasyonlarda bulunmaktadır. Bu tür mutasyonlar genin aktivitesini veya ürününü değiştirmediğinden sessiz mutasyonlar olarak kabul edilmektedir. Sessiz mutasyonda, kodonun üçlü yapısındaki bazın değişikliğinin tolere edilmesinden dolayı bu şekilde anılmaktadır. Sessiz mutasyonun belirlenmesi, genin baz dizisinin çıkarılmasıyla görülebilmektedir.

Kodonların yapısında bir değişiklik oluşarak protein sentezi sonucunda farklı bir aminoasid oluşuyorsa bu mutasyon tipine yanlış anlamlı mutasyon denilmektedir. Yanlış anlamlı mutasyonların proteinler üzerindeki etkileri değişkendir ve üç şekilde görülebilmektedir. Birinci olarak, aminoasid kendisiyle aynı fonksiyonel işleve sahip diğer bir aminoasid ile değiştğinde biyolojik olarak işlevini sürdürebilmektedir. İkinci olarak, protein işlevini kısmen yani düşük olarak sürdürmektedir. Üçüncü olarak ise, aminoasid proteinin tamamen değişmesine ve işlevini kaybedip görevini yerine getirememesine neden olabilmektedir [77].

Gen mutasyonları, bazen hiçbir aminoasidi üretmeyip protein sentezini durdurucu olan dur kodonlarına dönüşmesine neden olabilmektedir. Bu tür mutasyonlara anlamsız mutasyon adı verilmektedir. Anlamsız mutasyonda meydana gelen değişim sonucunda kodon yapısı değiştğinden dolayı protein sentezi sırasında zincir erken sonlanabilir ve kısmen üretilen protein işlevini yerine getiremeyeceğinden dolayı mutasyon önemli bir sorun haline almaktadır.

B. Çerçeve Kayması Mutasyonları

DNA'daki baz yapısına üç ve üçten fazla delesyonlar ya da insersiyon oluşumunda kodonların değişmesine sebep olan mutasyonlara çerçeve kayması (frame shift) mutasyonları denir. Bu mutasyonlar eksilen/eklenen baz sayısına ve inserisyon/delesyonun pozisyonuna bakılarak kötü sonuçlar doğurabilmektedir. Eğer bir gende üç ve üçün katı bir sayıda baz çifti insersiyonu veya delesyonu meydana gelirse, buna uygun sayıda amino asitin fazla veya eksik olduğu bir protein sentezlenir ve bu durumda çerçeve kayması olmadığı halde yine de mutant proteinin fonksiyonel olması ihtimali düşüktür [77].

3.2.3. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun parçalarında meydana gelen mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı değişimleri ve kromozom yapısı değişimleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

A. Kromozom Sayı Mutasyonları

Bütün organizmaların kromozom sayısı türden türe, cinsten cinse değişmektedir. Mayoz ve mitoz sırasında kromozomlar bazen tam ayrılmayabilir ve çeşitli kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Kromozom sayı değişimi mutasyonlarında, kromozom parçası kaybolur ya da sayı olarak artmaktadır. Öploidi ve anöploidi olmak üzere iki şekli vardır.

- **Öploidi**

Kromozomların bütün hepsinin mevcut sayısının katları halinde artması ya da kromozom takımının her birinin tek bir şekilde bulunması durumudur. Öploidi, monoploidi ve poliploidi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [78]. Mevcut kromozom sayısı canlılara diploid ($2n$), üç ve katları şeklinde kromozom içeren canlılara poliploidi denilmektedir. Triploid ($3n$), tetraploid ($4n$), pentaploid ($5n$) ya da daha çok sayıda kromozomlar takımını içeren canlılar oluşmaktadır [79].

Öploidi de çekirdek bölünmesi oluşmaktadır, fakat sitoplazma bölünmesi gerçekleşmemektedir. Bu durum endomitoz olarak adlandırılmaktadır. Endomitoz da, kromozomlar bölünme için iki katına çıkmaktadır. Mitozun profaz ve metafaz safhasından sonra anafaz, telofaz ve sitokinez gerçekleşmez. Bunun sonucu olarak da her bir bölünme sonucunda kromozom sayıları katlar halinde artmış olmaktadır [78].

Poliploidinin üçe ayrılmaktadır. Bunlar; Otopoliploidi (Otoploidi), Allopoliploidi (Allopoloidi) ve Endopoliploidi (Endoploidi)'dir.

Otopoliploidi: Kromozom katlarının hepsinin aynı cins türden gelmesi yani aynı türe ait olmasıdır. Örneğin, bir diploit ($2n$) bireyin genomu AA ise otopoliploid bireyler 3A (AAA), 4A (AAAA) şeklinde olurlar.

Allopoliploidi: Bir poliploidinin kromozom takımlarının farklı türlerden gelen kromozomlarla arttırılmasıdır. Birbirine yakın bir genetiği içeren iki farklı türün hibridizasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Hayvan hücrelerinde çoğunlukla enderdir, çünkü hayvanlarda çiftleşme her bir türe özgüdür. Bitki hücrelerinde çoğunlukla görülmektedir.

Endopoliploidi: Hücrenin çekirdeği içerisinde, mevcut kromozom sayısının n 'in çeşitli katları şeklinde, hücre zarı yok olmadan (hücre bölünmesi olmadan) artmasıdır.

- **Anöploidi**

Anöploid bir canlı, normal sayıdan fazla yada az kromozom içeren hücrelerin birleşmesi ile ortaya çıkmaktadır [78, 79]. Anöploidi durumu, kromozomların anafazda geri kalması ya da kromozomların bölünmesi sırasında ayrılmaması sonucuyla oluşabilmektedir. Metafazda, ekvatorial düzlemde dizilen kromozomlar, sentromerler aracılığıyla ters kutuplara doğru çekilirler. Fakat bazen kromozomlar bölünemez ve ayrı kutuplara gitmeyip tek bir kutba doğru çekilirler. Bu duruma ayrılmama (non disjunction) denir. Non disjunction olayı hem mitoz hem de mayoz bölünmede görülebilir [80].

Kromozomların kutba çekilirken, kromozom parçalarından birinin geri kalması olayına anafazda geri kalma (anaphase lagging) denilmektedir. Bu kromozomların çoğunluğu ya bir hücreye geçer ya da kaybolurlar. Eğer bir hücreye geçer ise o tarafta o kromozom parçasından iki tane bulunur iken, diğer hücrede o kromozom parçası bulunamaz. Fakat kromozom parçası olması gereken hücrede kalırsa, bir hücre normal kromozom sayısına sahip iken, diğer hücre kısmı kromozom eksikliği yaşamaktadır [80].

Anöploidi; monosomi, nullisomi ve polisomi olmak üzere üç şekilde olabilir.

Monosomi: Diploid olan bir bireyde, tek bir kromozom parçasının yok olması durumudur. Bu bir birey, mayoz bölünme esnasında, kromozomların ayrılmaması sebebiyle ve bir kromozomu eksik olan (n-1) bir gametle normal (n) kromozomlu bir gametin birleşmesi sonucunda meydana gelmektedir. Bu bireyin kromozom sayısı $2n-1$ olmaktadır.

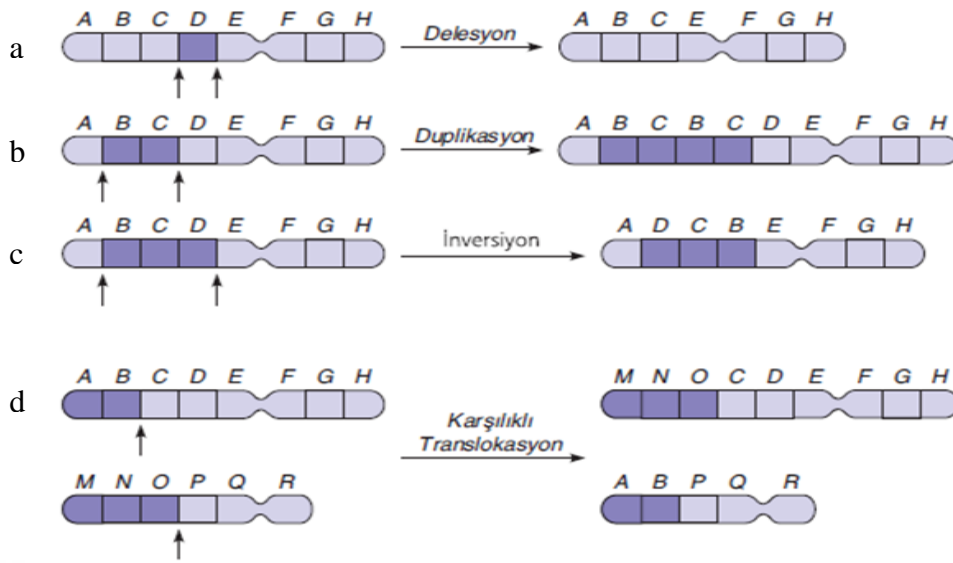
Nullisomi: Bir organizmada, bir kromozomun homoloğu ile birlikte eksik olması, bulunmaması olayıdır. Bu tip diploid bireyler $2n-2$ formülü ile gösterilirler. Nullisomik bireyler, ayrılmama olayı sonucu tesadüfen aynı kromozom çiftini kaybetmiş olan iki farklı gametin birleşmesiyle meydana gelmektedirler.

Polisomi: Bir takımda bulunan kromozomlardan birinin ya da birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır. Bununda Trisomi, Tetrasomi, Hiperploidi ve Hipoploidi gibi çeşitleri vardır.

B. Kromozom Yapı Değişimleri

Genetik materyalin yer değiştirmesi veya kaybı sonucunda oluşan bir veya birden fazla kromozom kırıklarının oluşması ile yapı değişimleri meydana gelmektedir. Kromozomlar doğal olarak kırılabilirler, fakat radyasyon ya da çeşitli kimyasallara maruz kalan canlı hücrelerinde kromozomların kırılma sayısı oldukça yüksektir. Kopan bir kromozom parçası tekrar yapışabileceği gibi bu parça kaybolabilmektedir.

Kromozomlarda kırılmalar sonucu oluşan parça kayıpları, delesyon veya artışlarını duplikasyon, parça yerleşim düzenlerindeki değişimleri inversiyon ve kromozomlar arası parça değiş tokuşlarını translokasyonu kapsamaktadır. Bu tip mutasyonlar kromozomların sayısını veya kromozomlardaki geniş bölgeleri ilgilendiren büyük değişimlerdir. Bu tür değişimlerle genlerin ya sayısı ya da yerleşim düzenleri değişir bunun sonucunda da bireyin fenotipinde kalıcı değişimler ortaya çıkar [80]. Şekil 3.3.'de Delesyon, duplikasyon, inversiyon ve karşılıklı traslokasyonun şekilleri gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Delesyon, duplikasyon, inversiyon ve karşılıklı traslokasyonun gösterilmesi

Delesyon: Eksilme veya delesyon, kromozom üzerinde oluşan bir kırık sonucu bir kromozom parçasının yerinden kopması anlamına gelmektedir (Şekil 3.3a). Kopan kromozom parçası sentromer içermiyorsa (asentrik ise) hücre canlılığını sürdürmez. Bunun nedeni, mayoz bölünme sırasında kromozomlar sentromer bölgelerinden kutuplara çekildiği için, sentromer taşımayan kromozom parçası kutuplara çekilemez ve parça kaybolur. Kopan parça kısmında sentromer bulunuyorsa, kopan parça ne kadar küçük olsada iğ iplikleri sentromerden tutunur ve kutuplara çekilir. Böylece hücre oluşumunda kendini göstermektedir. Kopma iki türlü olabilmektedir. Eğer bir darbe sonucu kromozom kopar ise terminal delesyon; iki darbe sonucunda parça kopar ise insersiyonel delesyon oluşur ve kopan kısım çıktıktan sonra iki parça yeniden birleşmektedir [80].

Duplikasyon: Duplikasyon, kromozomdaki bir gen parçasının kromozom üzerinde iki ya da daha çok tekrarla bulunması durumudur (Şekil 3.3b). Duplikasyonlu parça, sentromer içeren bir parça ya da bir kromozom parçası olabilmektedir. Duplikasyonlar, mayozda bölünme esnasında sinaps yapan kromozomlarda, eşit olmayan crossing over sonucunda ya da bir replikasyonda hata sonucu oluşabilmektedir. İlk durumda duplikasyon-delesyon oluşmaktadır [80].

Duplikasyonun üç değişik özelliği bulunur.

- Geninin kopyasının aynı kromozom üzerinde bulunmasını sağlayabilir.
- Delesyondaki gibi, fenotipik farklılıklar oluşabilir.
- Duplikasyonlar, evrim sürecinde, genetik çeşitliliğin önemli bir kaynağıdır.

İnversiyon: İversiyon, kromozom parçasının iki darbe alarak kırılması ve kopan kromozom parçasının 180 derece ters dönerek koptuğu kromozom parçasına yeniden bağlanmasıdır (Şekil 3.3c). Kapan parça eğer sentromer bölgesini içeriyorsa perisentrik inversiyon, sentromer içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak adlandırılır. Parasentrik inversiyonda, kodların oranı değişmezken perisentrik inversiyonda kolların oranı değişmektedir. Kırılma sonucu oluşan yapışkan uçlar, birbirleri ile tekrar birleşir. Böylece diziliş sırası değişmesine rağmen gen sayısı değişmez. Kromozom çiftinin her ikisinde de ters dönmeler var ise homozigot inversiyon olarak adlandırılırlar. Fakat homologların sadece bir tanesinde ters dönme var ise heterozigot inversiyon olarak adlandırılır. Mayozda heterozigot inversiyonlar, kromozomlar arasındaki eşleşme sadece inversiyon halkası oluşumu ile yapılabilir [80].

Translokasyon: Translokasyon, kromozomun bir parçasının ile homologu olmayan başka bir kromozomun bir kromozom parçasının yer değiştirmesidir (Şekil 3.3d). İki türü bulunmaktadır. Basit translokasyon, tek yönlü parça değişimini içermektedir. Resiprokal translokasyonda, iki homolog olmayan kromozomun parçalarının yer değiştirmesi olayıdır.

3.3. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları

3.3.1. Direkt Onarım ya da Hasarın Geri Döndürülmesi

A. Fotoreaktivasyon

DNA hasarında, hasarın geri çevrilmesi tamir için kolay bir işlemmiş gibi gözükmesine rağmen, kinetik ve termodinamik sebeplerden dolayı her zaman mümkün değildir. Bazen, enzimler yardımı ile (Fotolizaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) oluşan hasar onarılabilmektedir. Fotolizaz enzimi tarafından siklobütan pirimidin dimerleri ayrılarak hasar onarılabilmektedir. Bu oluşan reaksiyona fotoreaktivasyon denir [81]. Bu onarım şekli, UV aracılığı ile oluşan pirimidin dimerlerinin giderilmesi için kullanılmaktadır. Fotoreaktivasyonda sadece piridin dimerleri kırılır ve hata olasılığı yoktur.

B. O-6-Metilguanin Onarımı

O-6-Metilguanin, oldukça yüksek oranda alkilleyicidir. O-6-metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, normal guanin oluşumunu sağlamak için DNA'daki yanlış metillenen bazların yapısındaki CH₃ gruplarını kendi üzerindeki sistein rezidülerine almaktadır. Fakat bu transferi gerçekleştirirken enzim baskılanır ve geri dönüşümsüz bir şekilde işlevini kaybetmektedir.

C. Basit Tek Zincir Kırıklarının Tamiri

Peroksidler gibi bazı kimyasallar ya da X-ray gibi bazı ışınlar DNA üzerinde kırıklar oluşturabilmektedir. DNA'nın bir zincirinde oluşan kırıklar DNA ligaz enzimi tarafından onarılmaktadır. Bu onarım sırasında enerji gerektiren bir reaksiyon ile 3' OH grubu ile 5'-PO₄ grubu arasında bulunan fosfodiester bağı oluşarak hasar onarılmış olmaktadır [82].

3.3.2. Eksizyon (Kesip-Çıkarma) Onarımı

Ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunan ve üç temel basamak içeren en önemli onarım sistemlerinden biridir. Bu onarım mekanizmasında, DNA'da bulunan hasarlı bazların oligonükleotid olan parçaları çıkarır ve hatalı olan ve çıkarılan boş kısma doğru bazın eklenmesi ve oluşan boşlukların ligasyon ile kapatılmasını içermektedir [83].

- Hata ya da hasar bulunur ve enzim olan bir nükleaz ile kesip çıkarılır.
- Oluşan boşlukları DNA polimeraz enzimi doldurur.
- Boşluk DNA ligaz enzimi ile tamamen kapatılır [84].

Eksizyon (Kesip-Çıkarma) onarımı ikiye ayrılmaktadır.

A. Baz Eksizyon Onarımı

Bazlardaki her bir kimyasal değişim, DNA hasarının onarılmasında kendine has bir onarım sistemi gerektirir. Eksizyon onarımı, hücrelerdeki birçok kimyasal hasar tiplerini onarım sistemine sahiptir. Baz eksizyon onarımı, hasarlı bazları ya da yanlış eşleşen bazları yapıdan uzaklaştırmak için kullanılan bir onarım mekanizmasıdır [81, 85, 86].

B. Nükleotid Eksizyon Onarımı

DNA üzerindeki bazlara eklenen büyük parçaları tanıyan ve hasarı onarabilen mekanizmadır [87]. Bu onarım mekanizması, en ilkel canlıdan memelilere kadar kullanılan bir mekanizmadır. DNA'da oluşan birçok hasarın onarımında, en çokta heliks yapısının bozulmasına sebep olan hasarların onarımında etkili bir tamir mekanizmasıdır. İnsanlara, güneş tarafından gelen zararlı UV ışınlarının karsinojenik nedenli etkilerinde, cisplatin ve 4-nitrokuinolin oksid gibi zararlılar sonucu oluşan hasarlara karşı önemli bir onarım mekanizmasıdır.

Bu mekanizmada, UvrABC hasar spesifik endonükleaz (veya eksonükleaz) multi-fonksiyonlu enzim olarak adlandırılır. Bu enzim; UvrA, UvrB ve UvrC proteinlerinden (alt birimlerinden) oluşmaktadır. UvrA proteini, bir DNA bağlayıcı proteindir ve ATPaz aktivitesi bulunmaktadır.

UvrB proteininin ise tek başına ATPaz aktivitesi yoktur. UvrB, UvrA proteinine bağlanarak aktive olduğunda veya spesifik proteolizle ile yıkıldığında ATPaz aktivitesi kazanmaktadır.

Nükleotid eksizyon mekanizmasının işleyişi;

- Hasarlı bölgenin belirlenmesi,
- Protein komplekslerinin hasarın bulunduğu yere bağlanması,
- ~24-32nükleotid uzunluğundaki bir fragment olacak şekilde lezyonlu bölgenin iki tarafından da hasarlı kısmın kesilmesi,
- Hasarlı kısmın uzaklaştırılması,
- DNA üzerinde oluşan boşluğun DNA polimeraz enzimi tarafından doldurulması,
- Ligasyon bölümlerinden oluşmaktadır [81].

C. Yanlış Eşleşme (Mismatch) Eksizyon Onarımı

Yanlış eşleşme eksizyon onarımında, DNA replikasyonu sırasında oluşan, normal olan bazların yanlış bir baz ile eşleşmesi hatalarını ve hasarlarını onaran bir mekanizmadır [81]. Bu mekanizma, replikasyon sonrası işleyen bir tamir sistemidir. Mekanizmada iki adet farklı heterodinamik içeren proteinler bulunmaktadır. Yanlış eşleşme, genellikle replikasyonun bir hatası olarak görülürse de, onarım ve rekombinasyon işlemleri sırasında da yanlış eşleşme ihtimali olabilmektedir.

Yanlış eşleşme, her zaman eski zincirde olan bilgiye göre düzeltilmektedir. Onarım sisteminin, yeni sentezlenen zinciri ve eski zinciri ayırt edebilmesi gerekmektedir. İki zincirin artımı ise, eski zincir üzerinde bulunan ancak yeni sentezlenmiş zincirde üzerinde henüz bulunmayan metil grupları aracılığı ile oluşmaktadır. Dam metilaz enzimi, 5' GATC dizisindeki adenini N₆ pozisyonunda metillemektedir. Replikasyondan hemen sonra, yaklaşık ilk bir dakika içinde eski olan zincir metillenirken, yeni sentezlenen zincir üzerinde henüz bir metillenme olmamaktadır. Bu olay yeni zincirin bilinmesini sağlamaktadır [81].

E.coli yanlış eşleşme onarım sisteminde;

- MutH, MutS ve MutL proteinleri, anahtar role sahiptirler.
- MutS proteini, yanlış eşleşmiş baz çiftinin içinde bulunduğu geniş bir bölgeye bağlanmaktadır.

- MutH proteini, GATC dizisini içeren bölgeye bağlanmaktadır.
- MutL proteini ise, MutH ve MutS proteinlerini birbirine bağlayarak bir kompleks oluşturmaktadır.
- Sadece bir zincir GATC dizisinde metillenmiş ise, yanlış eşleşmiş baz çiftine yakınsa (ilk 1000 baz çifti içinde ise) MutH proteini bir bölgeye özel endonükleaz olarak metillenmiş kolu GATC dizisinin 5' ucundan kesmektedir. Böylece onarılabilecek olan kısım belirlenmiş olmaktadır.
- Metillenmemiş kolda kıvrım açılır, 3'→5' yönünde yıkıma uğratılmaktadır.
- Oluşan boşluk DNA polimeraz I ile doldurulduktan sonra zincir bağlanmaktadır.
- Bu işlemler, ekzonükleaz I, SSB, DNA helikaz II (DNA molekülünde sadece tek zincir 3'→5' yönünde yıkıma uğrar), DNA ligaz ve DNA polimeraz III gerektirmektedir.

3.3.3. Rekombinasyonel Onarım

Bu onarım mekanizması, replikasyondan sonra aktif hale gelmektedir. DNA'da hatalı ya da hasarlı parçanın değiştirilip, doğru zincirden kalıp alarak tamamlayıcı ipliğin bulunmadığı hallerde kullanılan bir sistemdir. DNA replike olurken timir dimerleri gibi bir hasar bulunduruyorsa, DNA polimeraz hasarlı kısımda durur ve lezyonun üzerinden geçerek orada bir boşluk bırakır. Bu esnada RecA adı verilen bir protein yapıya katılır ve rekombinasyonel bir şekilde değişim yaparak hatalı kısmı düzeltir. Daha sonra kalan boşluklar tekrar sentezlenerek kapatılmaktadır [82].

3.3.4. SOS Onarımı

Acil cevap sistemi adı verilen bu onarım sistemi, DNA hasarının çok fazla olduğu, diğer tamir mekanizmalarının yetersiz kaldığı zamanda devreye girmektedir. Çok ciddi DNA hasarlarında onarım mekanizmalarının zarara karşı hepsinin sayısı artmaktadır. Bu sistemde, replikasyon sırasında DNA polimeraz bir hasara rastlarsa bile replikasyona devam etmektedir. Yani replikasyon sırasında hasarlı kısım görmezden gelinmektedir. Bu sebeple bu sisteme hataya meyilli onarımda denilmektedir [82].

SOS onarımında, birçok proteini kodlayan genler LexA proteini ile normalde baskılanmış haldedir. DNA hasarı esnasında, hasarlı tek zincire Rec A proteini bağlanır ve Rec A-ssDNA kompleksi oluşmaktadır. RecA proteini, LexA proteininin otoproteolitik yıkımını DNA'ya bağlandıktan sonra aktive eder. RecA, DNA polimeraza bağlanarak lezyonu geçer ve DNA'nın replike olmasını sağlamaktadır. UmuC-UmuD kompleksi ile ve RecA proteini ile polimerazın 3'→5' ekzonükleaz (hata okuma ve çıkarma) aktivitesini baskılamasıyla hasarlı replikasyon gerçekleşmektedir.

3.3.5. DNA Çift Zincir Kırığı Onarımı

Çift zincir kırığı oluşumları, topoizomeraz inhibitörleri veya iyonize radyasyon sayılabilmektedir. Bu zincir kırıkları DNA'ya zarar veren önemli bir yıkımdır. Eğer hasar onarılmazsa kromozom kırılmalarına, hücre ölümlerine neden olabilmektedir. Yanlış onarılması sonucunda ise ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Bu onarım mekanizması, homolog olmayan ve homolog olan rekombinasyon olarak iki şekilde onarım göstermektedir.

3.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Bazı Yöntemler

Genetik toksisite veya genotoksisite; kromozom, çekirdek ve DNA'nın yapısında oluşan DNA kırıkları, kromozom anormallikleri, gen mutasyonları, anöploidi ve klastojenite gibi çeşitli hasar türlerini kapsayan bir terimdir. Genotoksik etki, DNA ile etkileşime girerek genomu hasara uğratan genotoksik maddelerin, DNA üzerinde hasara, kayıplara ve değişimlere yol açması olarak tanımlanabilir [88-90]. Karsinojenite ve genotoksisite arasındaki ilişki araştırılmıştır ve insanlar üzerinde karsinojen çoğu maddenin genotoksik bir yapıda olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda, kimyasal maddelerin etkileri araştırılmak üzere birçok tanımlama testleri ortaya çıkmıştır [88, 91-93].

Genotoksisite testleri 1970'den itibaren *in vivo* ve *in vitro* olarak kullanılmaktadır [88, 91]. Günümüze kadar, genotoksisiteyi ve karsinojeniteyi belirleyici birçok test grubu ortaya çıkmıştır [10].

Bu yöntemler; Salmonella/mikrozom mutajenite (Ames) testi, tek hücre jel elektroforezi (Komet testi), kromozomal anormallik testi (KA), mikronükleus (MN), allium testi, kardeş kromatid değişimi (KKD), TUNEL, immünokimyasal yöntemler, floresans *in situ* hibridizasyon (FISH), kromotografi, ELISA gibi çeşitli yöntemlerdir.

3.4.1. Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

Ames testi, belirli bir kimyasalın test organizmasının DNA'sında mutasyonlara neden olup olmadığını test etmek için bakterileri kullanan yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Test, bir bileşiğin karsinogenik potansiyelini tahmin etmek için hızlı ve uygun bir analiz görevi görmektedir.

Test suşları, histidin sentezlemek için gerekli olan genlerdeki frameshift (örneğin TA1537 ve TA1538 suşları) veya nokta (örn. TA1531 suşları) mutasyonlarını saptamak üzere özel olarak yapılandırılır, böylece farklı mekanizmalar yoluyla etki eden mutajenler tanımlanabilir. Bazı bileşikler oldukça spesifiktir, sadece bir veya iki suşta geri dönüşlere neden olmaktadır [94]. Test suşları ayrıca lipopolisakkarit sentezinden sorumlu genlerde mutasyonlar taşır, bakterilerin hücre duvarını daha geçirgen hale getirir [95], ve eksizyon onarım sisteminde testi daha duyarlı hale getirmektedir [96].

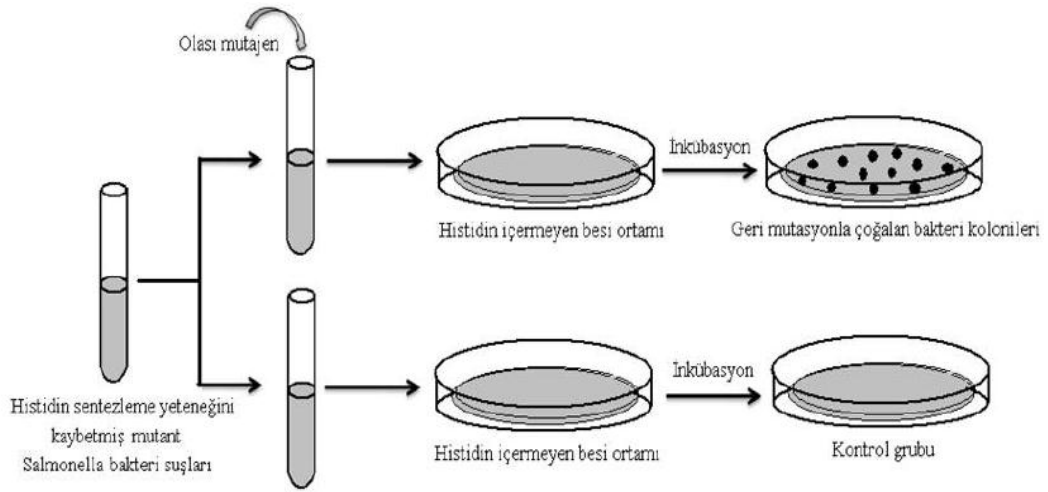
Memeliler gibi daha büyük organizmalar, mutajenik olarak kabul edilmeyen veya mutajenik olarak kabul edilen bir maddeyi potansiyel olarak dönüştüremeyen bir metabolizme sahiptirler. Bu nedenle, daha büyük organizmalar ile ilgili olarak bir kimyasal bileşiğin mutajenitesini daha etkili bir şekilde test etmek için, sıçan karaciğeri enzimleri, Ames Testinde test edilen bileşik üzerindeki metabolik süreçlerin etkisini çoğaltma girişiminde görülebilmektedir. Sıçan karaciğeri ekstresi isteğe bağlı olarak metabolizmanın etkisini simüle etmek için eklenir, çünkü benzo piren gibi bazı bileşikler mutajenik değil, metabolik ürünleridir [95]. Bakteriler az miktarda histidin ile agar plakasına yayılırlar. Büyüme ortamındaki histidin miktarı, bakterilerin başlangıç zamanı için büyümesini ve değişme fırsatına sahip olmasını sağlamaktadır. Histidin tükendiğinde, sadece kendi histidini üretme yeteneğini kazanmak için mutasyona uğramış bakteriler hayatta kalmaktadır. Plaka 48 veya 72 saat inkübe edilir. Bir maddenin mutajenitesi, gözlemlenen kolonilerin sayısı ile orantılıdır.

Ames testi ile saptanan mutajenler de olası kanserojenlerdir ve Ames tarafından yapılan ilk çalışmalar, bu test ile bilinen karsinojenlerin %90'ının tanımlanabileceğini göstermiştir [97]. Daha sonra yapılan çalışmalar, bilinen karsinojenlerin %50-70'inin tanımlandığını göstermiştir. Bu test, daha önce ticari ürünlerde potansiyel karsinojenler olarak kullanılan birçok bileşiği tanımlamak için kullanılmıştır [98]. Örnekler arasında plastikte alev geciktirici olarak kullanılan tris (2,3-dibromopropil) fosfat ve 1960'larda ve 1970'lerde Japonya'da gıdada antibakteriyel katkı maddesi olarak kullanılan çocuk pijamaları [99], ve furylfuramide gibi tekstiller kullanılmıştır. Furylfuramide aslında daha önce hayvan testinden geçmiştir, ancak Ames testinde tanımlandıktan sonra daha kuvvetli testler bunun kanserojen olduğunu göstermiştir.

Ames testinin ilginç bir sonucu, değişen kimyasal konsantrasyonlarını kullanan doz yanıtı eğrisinin neredeyse her zaman doğrusal olması [97], mutagenizasyon için eşik konsantrasyonunun olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, radyasyonlarda olduğu gibi, kimyasal mutajenler veya karsinojenler için güvenli bir eşik bulunmayabilir [100]. Ancak bazıları, organizmaların DNA onarımı gibi koruyucu mekanizmalara bağlı olarak düşük mutajenler tolere edebildiğini ve bazı kimyasal mutajenler için eşik bulunabileceğini öne sürmüştür [101]. Bruce Ames, hayvansal sistemlerde karsinogenizasyon testlerinde kullanılan yüksek dozdan, insan maruziyetinde normal olarak karşılaşılan kimyasalların daha düşük dozuna kadar doğrusal doza yanıt ekstrapolasyonuna karşı çıkmıştır. Çünkü sonuçlar, yapay olarak yüksek dozun neden olduğu mitojenik yanıtı dolaylı olarak yanıt olabilmektedir.

Ames testi, olası ilaçların olası karsinojenleri belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır ve Pestisit Yasası (ABD) altında gerekli olan sekiz testten biridir ve Zehirli Maddeler Kontrol Yasası uyarınca gerekli olan altı testten biridir. *Salmonella typhimurium* bir prokaryottur, bu nedenle insanlar için mükemmel bir model değildir. Sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu, memeli metabolik koşullarını taklit etmek için kullanılır, böylelikle hepatik sistemdeki bir ana molekülün oluşturduğu metabolitlerin mutajenik potansiyeli değerlendirilebilir. Bununla birlikte, test edilen kimyasalların mutajenitesini etkileyebilen insan ve sıçan arasındaki metabolizmada farklılıklar vardır [102]. Bu nedenle test, insan karaciğeri S9 fraksiyonu kullanılarak geliştirilebilir; kullanımı daha önce kullanılabilirliği ile sınırlandırılmıştır, ancak şimdi ticari olarak mevcuttur ve bu nedenle daha uygun olabilmektedir. Ökaryotik hücreler, örneğin maya için uyarlanmış bir in vitro model yapılmıştır.

Ames testinde tanımlanan mutajenlerin mutlaka kanserojen olması gerekmez ve testte tespit edilen herhangi bir potansiyel kanserojen için daha fazla test gereklidir. Nitrat grubunu içeren ilaçlar bazen gerçekten güvenli olduklarında Ames için olumludurlar. Nitrat bileşikleri, yanlış bir pozitif verebilen önemli bir sinyal molekülü olan nitrik oksit oluşturabilir. Ancak, gıdalardaki nitratlar, amin ve amidlerle reaksiyona girerek karsinojenler ürettiği bilinen nitritlere bakteriyel etki ile azaltılabilir. Bir Ames testini yürütmek için bu bileşiklerle uzun toksikoloji ve sonuç çalışmalarına ihtiyaç vardır. Şekil 3.4’de Ames testinin uygulama aşamaları ve mutajeniteyi gösteren koloniler gösterilmiştir [103].



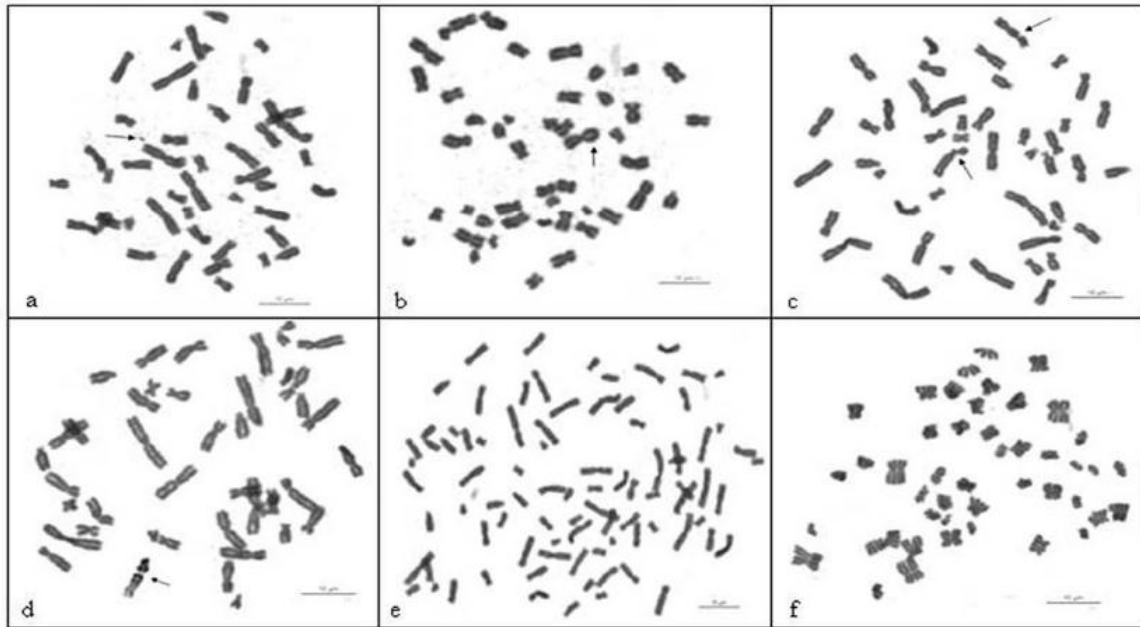
Şekil 3.4. Ames testinin uygulama aşamaları ve mutajeniteyi gösteren koloniler [103]

3.4.2. Kromozomal Anormallik (KA) Testi

DNA’da ortaya çıkan hasar sonucunda oluşan KA’lardaki kromozom kırıkları, DNA’da oluşan zincir kırıklarının onarılamayışı nedeni ile replikasyon sonucunda oluşan yeni kromozomlar, DNA’daki kırıkların hatalı onarılması sonucu meydana gelmektedir. Onarılamayan bu hasarların nedeni ile oluşan KA’nın kanser riskini işaret etmektedir [104-108].

KA testi, mutajenlerin sebep olduğu çeşitli KA'ların ortaya çıkarılmasında genellikle tercih edilmektedir. Test, *in vivo* ve *in vitro* olarak ayrılır ve memeli hücre kültürlerindeki kromozom anormalliğini belirlemede *in vitro* KA testi kullanılırken, *in vivo* KA testi ise çoğunlukla kemik iliği hücrelerindeki kromozomal anormalliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır. *İn vivo* KA testi, DNA tamir mekanizmaları gibi etkenlerin analiz edilmesine veya dokuya ve türe göre değişebilen metabolizmada, mutajenik hasarların belirlenmesine imkân sağlamaktadır [88, 109-111].

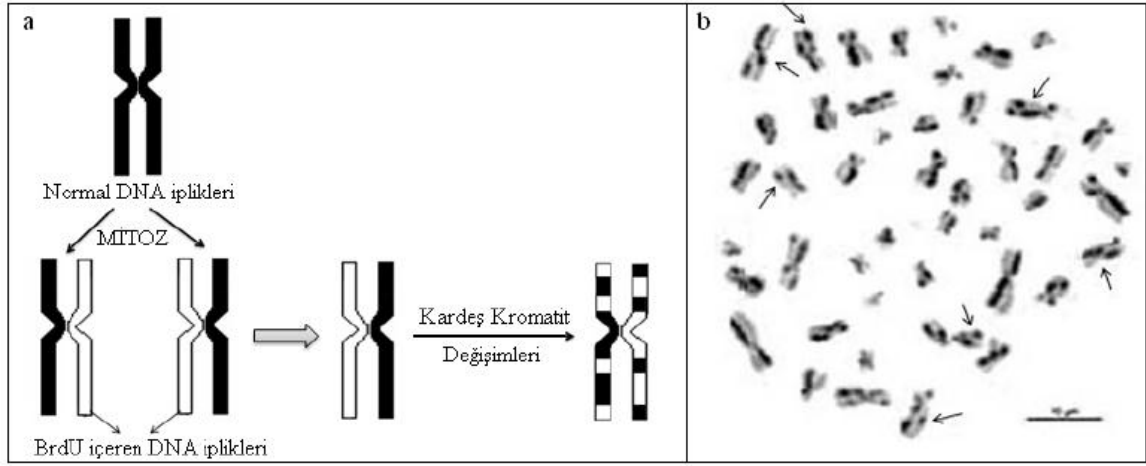
İn vivo KA ve *in vitro* memeli KA testini birbirinden ayıran diğer bir yönü, *in vivo* KA testinde vaskülarizasyonu hızlı ve yüksek dolaşım gerçekleştiren hücreleri kapsayan kemik iliği kullanılırken, *in vitro* KA'da genelde periferik kan lenfosit hücrelerin inkübasyonu tercih edilmektedir. *İn vitro* KA testinde oluşturulan kültürlerin alımı 2 saat öncesinde çoğunlukla, *in vivo* KA testinde ise hayvanlar alınmadan 2-4 saat öncesinde kolşisin uygulaması yapılarak yapılarak hücreler metafaz safhasında durdurulmaktadır. Kemik iliği hücrelerinden ya da kültürlerden protokole uygun bir şekilde alınmış olan metafaz hücreleri ile kromozomlarda oluşan çeşitli yapısal ve sayısal anormallikler (Şekil 3.5) saptanabilmektedir [109-112].



Şekil 3.5. Metafaz hücrelerinden elde edilen kromozomal anormallikler [113]
a: Fragment, b: Kardeş kromatit birleşmesi, c: Kromatit kırıkları, d: Kromozom kırığı,
e: Poliploidi, f: Endoreduplikasyon

3.4.3. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

Kardeş kromatit değişimi (KKD), iki özdeş kardeş kromatid arasındaki genetik materyalin değişimidir. Önce mitozda anafaz öncesi kardeş kromatid kompleksine ait bir kromatid üzerinde Giemsa boyama yöntemi kullanılarak keşfedilmiştir. Boyanma, birkaç parçanın boyalı olmayan kardeş kromatidine geçtiğini ortaya çıkarmıştır. Giemsa boyaması, istenen kromatide eklenen bromodeoksiüridin benzeri bazın varlığı nedeniyle belirlenebilmektedir [113]. Şekil 3.6'da kardeş kromatit değişiminin BrdU ile saptanması ve KKD içeren metafaz plakları gösterilmiştir [113].



Şekil 3.6. Kardeş kromatit değişiminin BrdU ile saptanması ve KKD içeren metafaz plakları [113]

KKD'nin nedeni bilinmemektedir, ancak birçok ürünün mutajenik testi olarak kullanılmakta ve kullanılmaktadır. Mitoz başına kromozom çifti başına dört ila beş kardeş kromatit değişimi normal dağılımda iken, 14-100 değişim normal değildir ve organizmaya bir tehlike oluşturur. KKD, Bloom sendromu da dahil olmak üzere patolojilerde, hücre tipine bağlı olarak, normalin 10-100 katından fazla rekombinasyon oranlarına sahiptir. KKD'ler de tümörlerin oluşumu ile ilişkili olabilmektedir [114].

KKD, B51 (+) Behçet hastalığında daha sık gözlenmiştir [114]. Tomurcuk mayası *Saccharomyces cerevisiae*'deki mitotik rekombinasyon, esas olarak vejetatif büyüme sırasında ortaya çıkan spontan veya indüklenmiş hasarlara yanıt veren DNA onarım işlemlerinin bir sonucudur [115].

Maya hücrelerinin homolog rekombinasyon ile hasarı onarabilmesi için, aynı çekirdekte, onarılacak bölge ile sekans homolojisi içeren ikinci bir DNA molekülü bulunmalıdır. Hücre döngüsünün G_1 fazında bir diploid hücrede, böyle bir molekül homolog kromozom formunda bulunmaktadır. Bununla birlikte, hücre döngüsünün G_2 fazında (DNA replikasyonunu takiben), ikinci bir homolog DNA molekülü de kardeş kromatiddir. Kanıtlar, yakın çevredeki özel ilişki nedeniyle, kardeş kromatidlerin rekombinasyon onarımı için substrat olarak sadece uzak homolog kromatidler üzerinde tercih edilmediğini, ancak homologlardan daha fazla DNA hasarı tamir etme kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir [115].

Doğal popülasyonlarda diploid organizmaların genomları, ekleme ve delesyonlar için oldukça polimorfiktir. Bu polimorfik bölgeler içinde meydana gelen mayoz bölünmesi çift sarmal kırılmaları, eş-homolog değişimden ziyade, kardeş kromatit değişimi ile onarılmalıdır. Maya tomurcuklanma mayozu sırasında, moleküler düzeyde bir rekombinasyon çalışması, kardeş olmayan homologda karşılık gelen dizilerin bulunmadığı bölgelerde çift sarmal kırılmaları tarafından başlatılan rekombinasyon olaylarının, kardeşler kromatidler arası rekombinasyon ile verimli bir şekilde onarıldığını göstermiştir. Bu rekombinasyon, homolog rekombinasyonla aynı zamanlamayla, ancak Holliday eklem moleküllerinin indirgenmiş (2 ila 3 kat) verimle gerçekleşmektedir. Bu çalışma ve diğer organizmalardan elde edilen karşılaştırılabilir kanıtlar, kardeşler arası rekombinasyonun mayoz sırasında sıklıkla meydana geldiğini ve esas olarak bir patika olmakla birlikte kardeş kromatidler arasında tüm rekombinasyon olaylarının üçte bir oranında gerçekleştiğini göstermektedir.

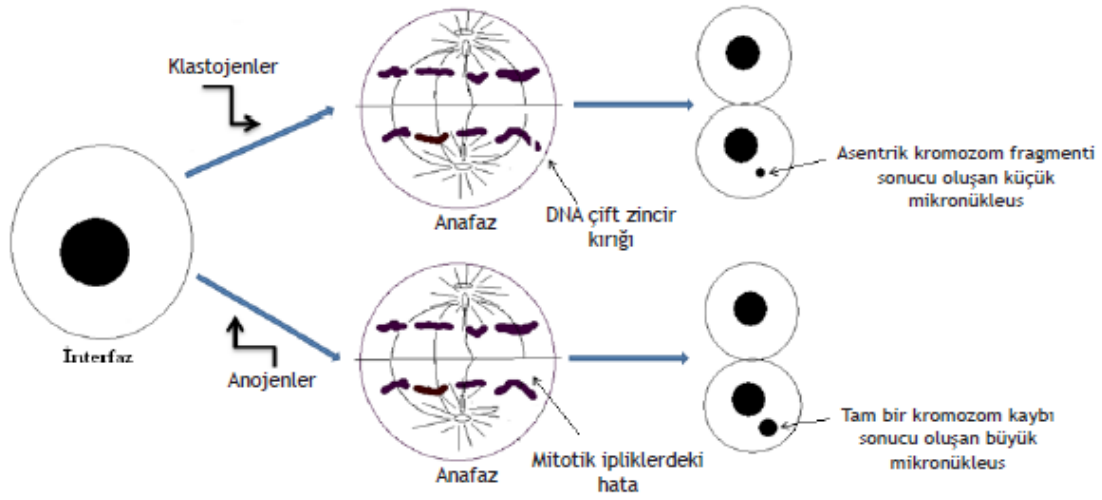
3.4.4. Mikronükleus (MN) Testi

Bir mikronükleus testi, potansiyel genotoksik bileşikler için toksikolojik taramada kullanılan bir testtir. Mikronükleus testi ilk olarak, *Vicia faba*'nın kök uçlarında kromozomal hasarı ölçmek için kullanılmıştır. Basit Giemsa boyası kullanılarak skorlaması yapılmıştır. Bu test genotoksik karsinojenler için en başarılı ve güvenilir deneylerden biri olarak kabul edilmektedir, yani genetik hasara neden olarak hareket eden ve kimyasalların test edilmesi için karsinojenlerdir [116]. Bu testin iki ana sürümü vardır, biri *in vivo* ve diğeri *in vitro* testlerdir.

In vivo testte çoğunlukla fare kemik iliği veya fare periferik kanını kullanılmaktadır. Bir kemik iliği eritroblast bir polikromatik eritrosit haline geldiğinde, ana çekirdek yok edilir; Oluşan herhangi bir mikronükleus, aksi takdirde anükleer sitoplazma da geride kalabilmektedir. Mikronükleusların görselleştirilmesi, bu hücrelerde ana çekirdeğe sahip olmadıkları için kolaydır. Tedavi edilen hayvanlarda mikronükleer polikromatik eritrositlerin sıklığında artış, indüklenen kromozom hasarının bir göstergesidir. Daha sonra, sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) yöntemi geliştirilmiş; burada nükleer bölmeden sonra sitokinezi önlemek için, mil düzeneğinin bir inhibitörü olan Cyt-B kullanılmıştır. CBMN yöntemi, farklı mutajenlerin neden olduğu kromozomal kayıp, kırılma ve ilişkili apoptoz ve nekrozun değerlendirilmesi için kullanılmaktadır [116].

Mikronükleus, mitoz veya mayozun anafazı sırasında oluşan düzensiz (üçüncü) çekirdektir. Mikronükleus, anafaz sırasında zıt kutuplara taşınmamış olan, kromozom veya bütün kromozomun bir kısmına sahip sitoplazmik cisimlerdir. Oluşumları, bir kromozomun bir kısmının veya bir kısmının eksik olduğu kardeş hücrelerine yol açmaktadır. Bu kromozom fragmanları veya bütün kromozomlar normal olarak nükleer membranlar geliştirir ve üçüncü bir çekirdek olarak mikronükleus olarak meydana gelmektedir. Sitokinezden sonra bir adet hücre bir nükleus ile biter ve diğeri bir büyük ve bir küçük nükleus, yani mikronükleus ile bitmektedir. Daha fazla genetik hasar meydana geldiğinde birden fazla mikronükleus oluşması ihtimali vardır. Mikronükleus testi, çeşitli kimyasalların genotoksisite değerlendirmesi için bir araç olarak kullanılmaktadır. Prosedür ve değerlendirme açısından kromozomal aberasyon testinden daha kolaydır.

Sentromer bölgesine hedeflenen proplarla floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanarak bir bütün kromozomun veya sadece bir parçanın kaybolması durumunda belirlenebilir. Şekil 3.7’de klastojenlerin ve anojenlerin etkisiyle uyarılan hücrelerdeki MN’ler gösterilmiştir [113].



Şekil 3.7. Klastojenlerin ve anojenlerin etkisiyle uyarılan hücrelerdeki MN’ler [113]

3.4.5. Allium Testi

Test sistemleri, kullanılan biyolojik sisteme ve tespit edilen genetik uç noktalarına göre gruplara ayrılabilir. Prokaryotlu biyo-tahliller, gen mutasyonunu ve primer DNA hasarlarını indükleyen ajanların saptanmasını sağlamaktadır. Diğer taraftan, ökaryotlarda yapılan analizler sonucu, gen mutasyonları ve kromozom hasarlarına, anöploidilere kadar değişen, büyük bir hasar derecesinin tespitini mümkün kılmaktadır [117]. Yüksek bitkiler, çevresel kirlenmeleri değerlendirmek için iyi genetik modeller yapan ve gözleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan özellikleri sunmaktadır. Bununla birlikte, bu özellik sadece farklı ortamlardaki mutajenleri saptama duyarlılığından değil, aynı zamanda farklı organ ve dokulardaki hücrelerde nokta mutasyonlarından KA’ya kadar değişen birçok genetik son noktayı değerlendirme olasılığından da kaynaklanmaktadır [118].

Halen, çevresel kirlenmeyi değerlendirmek için kullanılan yüksek bitki türleri arasında *A. cepa*, *Zea mays*, *Vicia faba*, *Nicotiana tabacum*, *Tradescantia*, *Hordeum vulgare* ve *Crepis capillaris* kullanılmaktadır [118]. Kullanılan bu bitkiler arasında *A. cepa* ($2n=16$), büyük kromozomlar ve düşük bir sayıdaki iyi kromozom koşullarının varlığı nedeniyle mitotik döngüdeki kromozom hasarlarını ve bozulmalarını değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu test sistemi çevresel kimyasalların tespitinde yüksek hassasiyet göstermiştir.

A. cepa'nın bir test sistemi olarak kullanılması, kolşisin kullanımına bağlı olarak mitotik indeksteki hataları gösteren Levan [119] tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, farklı organik tuz çözeltilerinin *A. cepa*'nın meristematik kök hücrelerinde çeşitli KA tiplerini indüklediğini göstermiştir [120]. O zamandan beri, *A. cepa* testinde, çevresel numunelerin ve saf maddelerin çoğunu tanımlayan karmaşık karışımlar olarak kimyasalların daha kapsamlı bir değerlendirmesini sağlamak için kullanılan test sistemlerinde çeşitli değişiklikler yapılmıştır [121-123]. *A. cepa* testinin ilk uyarlamaları Fiskesjo tarafından yapılmıştır ve çevresel izleme için bir test organizmasına dönüştürülmüştür. Bu amaçla, hem suda çözünür hem de çözünmeyen bileşiklerin değerlendirilmesinde ve karmaşık karışımların etkilerini değerlendirmede değişiklikler önerilmiştir. Rank ve Nielsen [124] testte yeni değişiklikler önererek karmaşık karışımları analiz etmeyi daha da verimli hale getirmiştir. Bununla birlikte, yazarlar tarafından önerilen tüm modifikasyonlar, genotoksik ajanları potansiyel olarak tanımlayan KA'nın değerlendirilmesiyle ilgilidir.

A. cepa testi birçok araştırmacı tarafından düşük maliyetli ve kolay kullanım testi olarak kabul edilmiştir, bu da çevresel izlemede kullanılan diğer kısa süreli testlere göre bazı avantajlar sunmaktadır [124-127]. Bu avantajlar; kısa sürede ve kolay olması, yüksek hassasiyete sahip ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, makroskopik (büyüme, EC_{50}) ve mikroskobik (c-mitoz, yapışkanlık, kromozom kırıkları) etkiler arasında iyi bir korelasyon göstermesi ve organik kirleticilerin sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılan bitki test sistemidir. Rank ve Nielsen [125, 126] 'e göre, *A. cepa* testinin avantajlarından biri, test organizmasını test numunesinin daha önce işlem görmeden doğrudan karışımlara maruz bırakma olasılığıdır. *A. cepa* testinde incelenen parametreler aşağıda verilmiştir.

A. Mitotik İndeks

Hücre döngüsünde, bölünme safhasında bulunan toplam hücrelerin sayısı ile karakterize edilen Mİ, çeşitli ajanların sitotoksitesini değerlendirmek için bir parametre olarak kullanılmıştır. Bir ajanın sitotoksite seviyeleri Mİ'deki artış veya azalış ile belirlenebilmektedir. Fernandes'e [128] göre, negatif kontrol grubundan önemli ölçüde daha düşük Mİ'ler, maruz kalan organizmaların büyümesi ve gelişmesindeki kimyasal etkisinden kaynaklanan değişiklikleri gösterebilir. Diğer taraftan, negatif kontrolden daha yüksek Mİ'lar, hücrelere zarar verebilecek bir hücre çoğalması, hatta düzensiz hücre çoğalmasına ve hatta tümör dokularının oluşumuna yol açabilecek bir artışın sonucudur denilmiştir. Bununla birlikte, Mİ'deki azalma ve artış, özellikle toksik ve sitotoksik potansiyel sunan kirletici maddelerin değerlendirilmesi için çevre kirliliğinin izlenmesinde önemli göstergeleridir. Smaka-Kincl ve arkadaşları [129], *A. cepa* meristematik hücrelerinin Mİ'sindeki azalmanın, ortamdaki sitotoksik ajanların varlığını belirlemek için güvenilir bir yöntem olarak kabul edilebileceğini ve dolayısıyla kirlilik seviyelerini tahmin etmek için hassas bir test olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. [128, 130-135].

B. Kromozom Anormallikleri

KA, hem kendiliğinden hem de fiziksel veya kimyasal maddelere maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkabilecek kromozomal yapıdaki ve/veya toplam kromozom sayısındaki değişiklikler ile karakterize edilmektedir. Yapısal kromozomal değişiklikler, DNA kırılmaları, DNA sentezinin inhibisyonu ve hasara uğramış DNA'nın replikasyonu gibi birçok faktör tarafından indüklenebilmektedir. Sayısal KA'lar, ör. anöploid ve poliploidi, kendiliğinden veya anöjenik ajanların etkisiyle ortaya çıkabilen anormal kromozomların ayrılmasının sonuçlarıdır [136]. *A. cepa* testi ile kromozom anormalliklerini değerlendirmek için, hücre bölünmesinin farklı fazlarında (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) çeşitli KA tipleri göz önüne alınmaktadır. Bununla birlikte, bu analizin yapılması basit değildir, çünkü hücre bölünmesi aşamaları ve olası anormallikleri hakkında doğru bir bilgi gerekmektedir.

Bu sorun nedeniyle Rank ve Nielsen [125], sitoloji alanında çalışmayan bilim adamları için KA analizini kolaylaştırmak amacıyla *A. cepa* testini uyarlamıştır. Bu nedenle, bu araştırmacılar anormalliklerin sadece anafaz ve telofazdaki analizini önermişlerdir [136].

2003 yılında, anafazlar ve telofazlardaki KA analizine dayanarak *Allium* testini tanımlayan başka bir çalışma yayınlamıştır. Bununla birlikte, başlangıçta Fiskeşjo tarafından önerilen hücre döngüsünün tüm aşamalarında farklı KA tiplerinin analizi, test edilen ajanların eylemlerinin daha iyi araştırılmasını teşvik ettiği için daha kapsamlı ve doğru bir değerlendirme yapılmasını sağlamaktadır. Klastojenik ve/veya anöjenik test organizmasının DNA'sı üzerindeki etkileri ve hatta muhtemel gelişimleri araştırılmıştır [128, 130-132].

Basit bir şekilde, kromozom köprüleri ve kopmaları gibi KA, bir klastojenik etki göstergesidir; oysa kromozom kayıpları, gecikmeler, yapışma, çok kutupluluk ve C-metafazlar, anöjenik etkilerden kaynaklanmaktadır.

C. Nükleer Anormallikler

Bazı araştırmacılar son zamanlarda *A. cepa* meristematik hücrelerinde KA analizine başka bir veri daha eklemişlerdir. Bu veri nükleer anormallikleri (NA) belirtmektedir. NA, test edilen maddenin etkisinin bir sonucu olarak, çekirdeklerdeki morfolojik değişiklikler ile karakterize edilmektedir. Genel olarak, bu değişiklikler *A. cepa* testinde lobüler çekirdekler, nükleer tomurcukları taşıyan çekirdekler, polinükleer hücreler, mini hücreler ve diğerleri gibi gözlenmektedir [128, 130, 135]. KA ile birlikte NA değerlendirmesinin, maruz kalan organizmaların DNA üzerindeki etkileri ile ilgili olarak test ajanı eylemlerinin araştırılmasını daha doğru yapmak için hassas bir analiz olduğu gösterilmiştir. Leme ve arkadaşlarına göre [130], lobüler çekirdeklerin ve polinükleer hücrelerin varlığı, bir hücre ölüm sürecini gösterebilir, çünkü bu anormallikler, *A. cepa* köklerinin F₁ hücrelerinde gözlenmemektedir.

3.4.6. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi (Komet Testi)

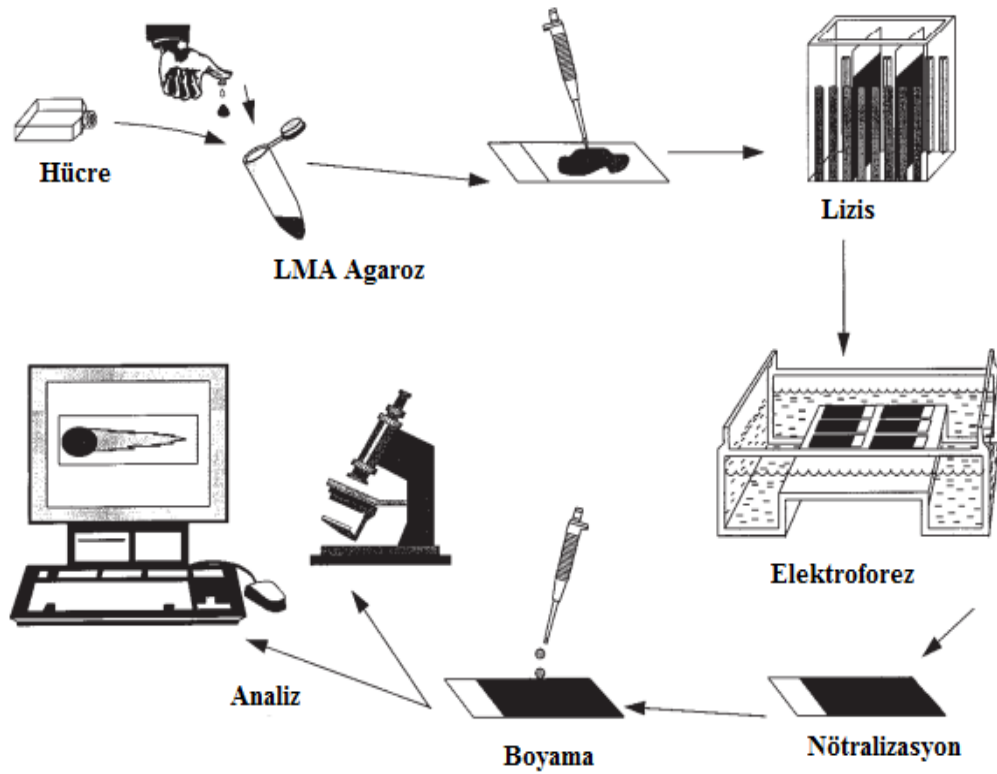
İlk kez 1978 yılında DNA üzerinde tek zincir kırıkları Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir [137]. Lam üzerine yerleştirilen hücrelerin agaroz jel ile birlikte gömülüp sabitlenmesinden sonra DNA'nın sarmal yapısının açılmasını sağlamak için alkali ortamda bekletilip hücre zarının parçalanması ve proteinlerden uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra nötralizasyon işleminden geçen hücreler DNA akridin turuncusu yardımıyla boyanmıştır. Tek zincir DNA kırıklıklarında kırmızı floresans, çift zincir DNA kırıklıklarında ise yeşil floresansın durumuna göre DNA üzerindeki hasar oranını tespit etmişlerdir. Sonrasında ise Ostling ve Johanson [138] tarafından DNA üzerinde oluşan kırıklıkların hassas bir şekilde tespit edilmesi için 1984 yılında mikro jel elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamalarının üzerindeki agaroz jele gömülür, yoğun lizis çözeltisinde bekletilerek hücrelerin membranlarının parçalanması sağlanır sonrasında nötr pH ortamında kısa bir elektroforez uygulanır ve DNA'lara noda doğru yürütülür. Anoda doğru yürütülen DNA'lara bakıldığında ise fazla sayıda zincir kırığı olanların az sayıda zincir kırığı bulunan DNA'lara göre daha hızlı göç ettiğini tespit etmişlerdir. Son olarak DNA hasar oranını belirlemek için ise anoda doğru göç eden DNA'ları Etidyum Bromür ile boyayarak hasar oranını floresans yoğunluğuna göre belirlemişlerdir [138].

DNA üzerinde meydana gelen çift sarmal kırıkları nötr ortamda tespit edilip, tek sarmal kırıkları tespit edilemediği için, Singh ve arkadaşları [139] tarafından 1988'de elektroforez, kuvvetli alkali ortamda (pH>13) uygulanmıştır. Günümüzde birçok çalışmada sıkça kullanılan "Komet testi" Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş yalnızca alkali şartlarda meydana gelen DNA tek zincir kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Son yıllarda FISH tekniği ile belirli DNA dizilerine spesifik olan işaretli probalar kullanılarak Komet testi ile birleştirilerek dizideki veya gendeki spesifik hasar belirlenebilmektedir.

Komet yönteminin en önemli avantajı çeşitli hücre tipleri üzerinde çalışılabilmesidir. Yöntemin DNA hasarı tespitinde tercih edilmesi basit, hızlı, duyarlı olması, radyoaktif işaretleme gerektirmemesinden kaynaklanmaktadır [140].

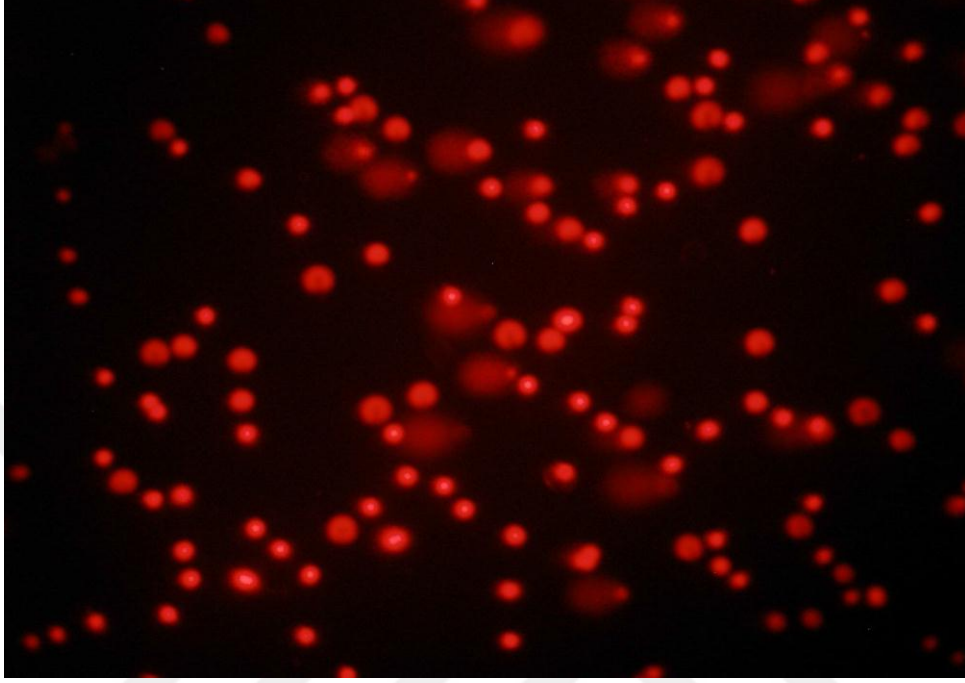
Komet yönteminin dezavantajlarından bazıları ise tek hücre verisi, küçük hücreli numune, uygulama esnasında dikkat ve el becerisi gerektirmesi ve sonuçların yorumlanmasıdır.

Şekil 3.8. Alkali Komet tekniğinde basamakları şematik olarak gösterilmiştir [141]. Komet yöntemi uygulanırken öncelikle, canlı dokulardan izole edilmiş olan nükleus içerisindeki DNA ince bira garoz jelin içine gömülür. DNA'nın süperkoil yapısının açılması ve kırıkların ortaya çıkması için alkali ortamda lizis çözeltisine konular ve sonrasında elektroforetik mekanizma içerisinde yürütme işlemi yapılır. Fiziksel veya kimyasal mutajenlerle hasar görmüş DNA'lar onarım mekanizmaları tarafından onarılmayıp, tek veya çift zincirlerinde kırıklar oluşarak molekül ağırlığı ve elektrik yüklerine bağlı olarak elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederler. Sonrasında hasar görmüş DNA, DNA'ya özgü olan EtBr gibi boya ile boyanıp floresan mikroskop altında incelenir.



Şekil 3.8. Alkali Komet tekniğinde basamakların şematik gösterimi [141]

Şekil 3.9’da farklı derecelerdeki DNA hasarının mikroskop altındaki görüntüsü gösterilmiştir [142].



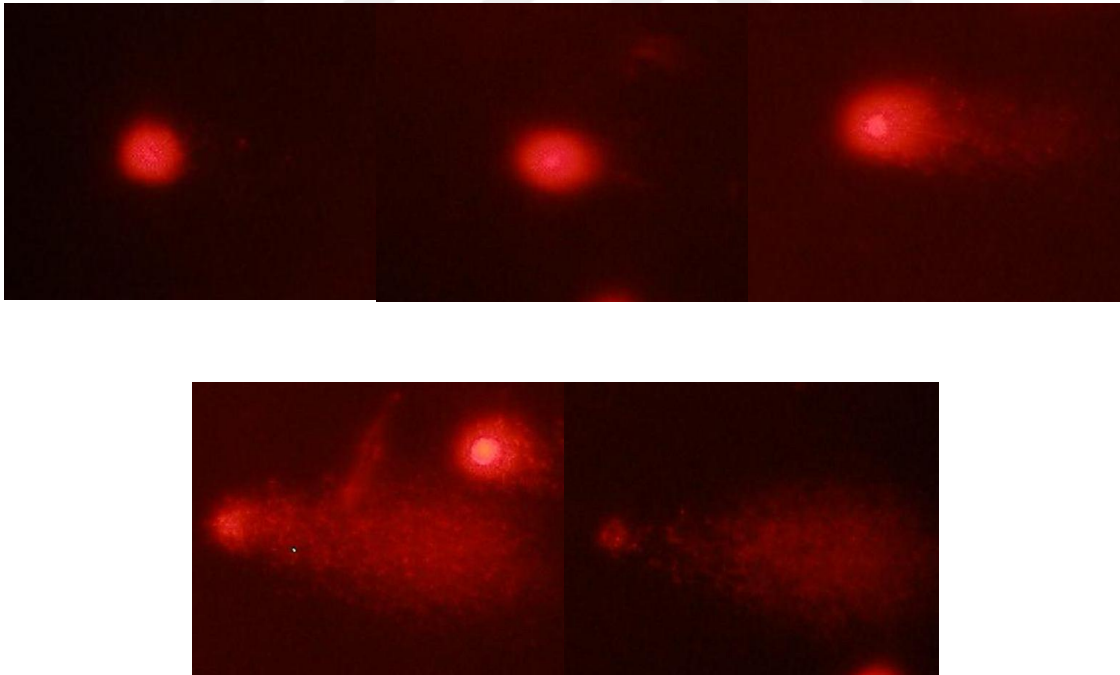
Şekil 3.9. Farklı derecelerdeki DNA hasarının mikroskop altındaki görüntüsü [142]

Komet testi, hasarı tespit etmek için çok yönlü bir tekniktir ve protokole yönelik ayarlamalar, DNA değişikliğine uğrayan lezyonların (hasarların) çok çeşitli varlığını ölçmek için kullanılabilir. Genellikle tespit edilen hasar tek iplik kırılmaları ve çift iplik kırılmalarıdır. Tek iplikçik kırılmalarını tespit etmek için bazik koşulların ve DNA'nın tamamen denatürasyonunun gerekli olduğu belirtilmektedir [143, 144]. Ancak bu doğru değildir, nötr koşullarda hem tek hem de çift iplik kopmaları da tespit edilmektedir [145, 146]. Bununla birlikte, alkali koşullarda, DNA hasarı olarak ilave DNA bozuklukları tespit edilir; AP bölgeleri (bir pirimidin veya pürin nükleotidinden yoksun olan abazik bölgeler) ve eksizyon onarımının yapıldığı yerlerdir.

Komet testi, son derece hassas bir DNA hasar tahlilidir. Bu duyarlılık, sonuçların tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek fiziksel değişikliklere karşı hassas olduğu için dikkatle ele alınmalıdır. Esas olarak, araştırılan faktör(ler) dışında DNA hasarına veya denatürasyona neden olabilecek her şeyden kaçınılmalıdır.

Genotoksisite, DNA oluşan zincir kırıkları nedeni ile oluştuğundan Komet testi ile belirlenebilmektedir [147, 148]. *In vivo* ve *in vitro* genotoksikoloji alanında Komet testi önemli bir uygulamayla herhangi bir organ dokusundan ya da farklı bir hücre tipinden alınan her bir hücre bu test ile belirlenebilmektedir. Mutajenitesi ya da genotoksisitesi belirlenmiş farklı tipteki hücrelerin spesifik aktivasyonları veya genotoksik etkisi belirlenmemiş olan çeşitli kimyasalların toksik ve doz toksisite etkileri Komet testi ile belirlenebilmektedir. Genotoksisite araştırmalarında Komet testi, araştırmalarda kullanılan diğerk test çeşitleri ile karşılaştırıldığında, her bir insan ya da hayvan dokusunda az bir hücre miktarına ihtiyaç duyması yönünden DNA'da oluşan kırıkları gösterebilmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bütün test bir gün içerisinde belli olur ve görüntülenmeye imkan vermektedir [148].

Mikroskop altında incelenen DNA'lar (soldan sağı) 0 (hasarsız), 1 (hafif hasar), 2 (orta hasar), 3 (ciddi hasar), 4 (tam hasar) olarak beş grup altında değerlendirilmektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri 0: Hasarsız, 1: Hafif hasar, 2: Orta hasar, 3: Ciddi hasar, 4: Tam hasar [142]

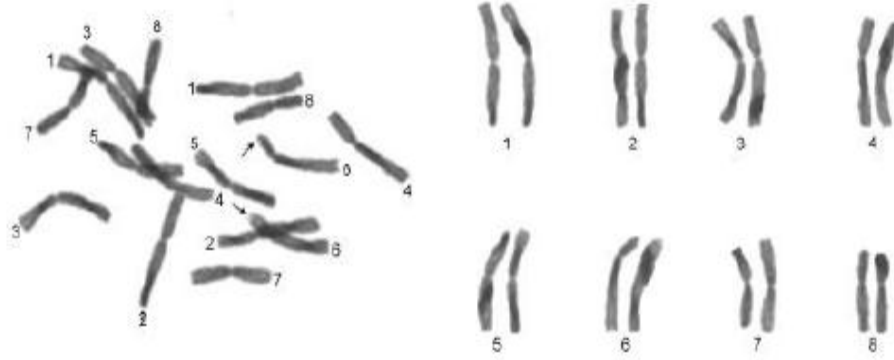
4. MATERYAL ve METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Çalışmada Kullanılan Organizma

A. cepa

A. cepa ($2n=16$, Şekil 4.1); elde edilmesinin kolay ve ucuz olması, çok iyi çimlenmesi, kromozomlarının büyüklüğü, kromozom sayısının azlığı ve sene süresince çok fazla kök ucu oluşması ve bu kök uçları test maddeleri ile direkt etkileşim halinde bulunması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromozomları kolay gözlemlenebilmektedir. Kromozom analizleri oldukça basittir [149].



Şekil 4.1. *A. cepa* L.'nin karyotipi [130]

4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Sıra No	Kimyasal Adı	CAS No	Alındığı Yer
1	2-Kloropiridin	109-09-1	Sigma Aldrich
2	Etidyum Bromür (EtBr)	1239-45-8	Sigma Aldrich
3	Magnezyum Klorid Hekzahidrat (MgCl ₂ .6H ₂ O)	7791-18-6	Sigma Aldrich
4	Triton X-100	9002-93-1	Sigma Aldrich
5	Potasyum Fosfat Monobazik (H ₂ KPO ₄)	7778-77-0	Sigma Aldrich
6	Sodyum Fosfat Dibazik-Heptahidrat (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	7782-85-6	Sigma Aldrich
7	Potasyum Klorür (KCl)	7447-40-7	Sigma Aldrich
8	Sodyum Klorür (NaCl)	7647-14-5	Sigma Aldrich
9	Sodyum Hidroksit (NaOH)	1310-73-2	Sigma Aldrich
10	Trizma Hidroklorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCl)	1185-53-1	Sigma Aldrich
11	Trizma Baz (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	77-86-1	Sigma Aldrich
12	Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	6381-92-6	Sigma Aldrich
13	Düşük erime noktasına sahip agaroz jel (LMPA)	39346-81-1	Sigma Aldrich
14	Normal erime noktasına sahip agaroz jel (NMPA)	9012-36-6	Sigma Aldrich
15	Absolüt Alkol (Etanol)	64-17-5	Carlo Erba
16	Basik Fuksin	569-61-9	Sigma Aldrich
17	Hidroklorikasit (HCl)	7647-01-0	Fluka
18	Potasyum Metabisülfid (K ₂ S ₂ O ₅)	16731-55-8	Sigma Aldrich
19	Metilmetansülfonat (MMS)	66-27-3	Sigma Aldrich
20	Glasiyal Asetik Asit	64-19-7	Sigma Aldrich

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar

Sıra No	Cihaz Adı	Marka/Model
1	Mikrosantrifüj Tüpleri - P.P- 1,5 mL	IsoLab
2	Lam-Lamel	IsoLab
3	Pipetler (0,5-2 µL, 0,5-100 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL, 1-5 mL)	Eppendorf
4	Otoklav	Nüve / NC-90L
5	Hotplate	Thermolyne
6	pH Metre	WTW™ Profiline™ pH 3210
7	Buz Makinesi	Flake / IMS-50
8	Manyetik Karıştırıcı	Daihan / MSH-20
9	Vorteks	Daihan / VM-10
10	Elektroforez ve Güç kaynağı	Clever / Clever / CS 300V
11	Soğutmalı Santrifüj	Awel / MF 20-R
12	Su Banyosu	Nüve / NB 20
13	Saf Su Cihazı	Millipore / Direct Q-3 UV
14	Buzdolabı	Vestel
15	Hassas Terazı	Precisa/LS 220 A SCS
16	Trinoküler Araştırma Mikroskobu	BAB/TAM-F

4.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

PBS Çözeltisi (10X)

Kimyasallar	100 mL
Sodyum Klorid (NaCl)	8 g
Potasyum Klorid (KCl)	0,2 g
Potasyum Fosfat Monobazik (H ₂ KPO ₄ P)	0,2 g
Disodyum Hidrojen Fosfat (HNa ₂ O ₄ P)	1,15 g
Trizma Hidraklorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCl, MW= 157,6)	3,2 g

Maddeler 80 mL distile suda çözüldükten sonra pH 7,4'e ayarlanarak son hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çalışmada 1X PBS kullanılmıştır. Her çalışmadan önce 1X'lik çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

$$1X \text{ PBS} = 1 \text{ mL stok PBS (10X)} + 9 \text{ mL dH}_2\text{O}$$

Nükleus İzolasyon Tamponu

Kimyasallar	50 mL
Tris (pH 7,5-0,2 M)	10 mL
Distile Su	40 mL
Magnezyum Klorid Hekzahidrat (MgCl ₂ .6 H ₂ O)	0,0425 g
Triton X-100 (% 0,5)	250 µL

Maddeler çözüldükten sonra son hacim istenilen miktarda distile su ile tamamlanarak pH 7,5'e ayarlanmıştır.

Tris (0,2 M) Çözeltisi

Kimyasallar	50 mL
Distile Su	40 mL
Trizma Baz ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, MW= 121,14)	1,211 g

Trizma baz 40 mL'de suda çözüldükten sonra pH 7,5'e ayarlanarak son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMPA) Çözeltisi (%1,5'luk)

0,03 g LMPA tartılıp üzerine 2 mL 1X'lik PBS eklenip ısıtılarak %1,5'lik LMPA çözeltisi hazırlanmıştır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (NMPA) Çözeltisi (%1'lik)

0,02 g NMPA tartılıp üzerine 2 mL 1X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak %1'lik NMPA çözeltisi hazırlanıp ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayılmıştır.

Nötralizasyon Tamponu

Kimyasallar	1000 mL
Distile Su	800 mL
Trizma baz ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, MW=121,14)	48,5 g

Trizma baz 800 mL'de suda çözüldükten sonra pH 7,5'e ayarlanıp ve son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Elektroforez Tamponu

Kimyasallar	1000 mL
Soğuk Distile Su	800 mL
Sodyum Hidroksid (NaOH)	12 g
Etilendiamintetraasetik asit	0.36 g

İstenilen hacime tamamlanarak pH>13 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Etidyum Bromür (EtBr) Çözeltisi (Stok)

Kimyasallar	50 mL
Etidyum Bromür	10 mg
Distile Su	50 mL

Stok çözelti oda sıcaklığında saklanmış ve çalışma sırasında kullanmak için stok EtBr çözeltisinden 1 mL alınıp 9 mL dH₂O ile tamamlanarak çalışma için kullanılacak EtBr çözeltisi hazırlanmıştır.

1 N HCl Çözeltisi (%37'lik)

Kimyasallar	25 mL
Hidroklorik asit (HCl, %37'lik)	2,1 mL
Distile Su	22,9 mL

Distile su üzerine istenilen miktar HCl eklenerek hazırlanmıştır.

Glasiyal Asetik Asit (%45'lik)

Kimyasallar	100 mL
Glasiyal Asetik Asit (%45'lik)	45 mL
Distile Su	55 mL

Distile su üzerine istenilen miktar glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Pozitif Kontrol Çözeltisi (MMS)

Kimyasallar	10 ppm
Metilmetan sülfanat (MMS)	0,001 g
Distile Su	1000 mL

Distile su üzerine istenilen miktar MMS eklenerek hazırlanmıştır.

Carnoy Fiksatif

Kimyasallar	100 mL
Absolüt Alkol	75 mL
Glasiyal Asetik Asit	25 mL

İstenilen miktarda absolüt alkol üzerine glasiyal asetik asit eklenerek hazırlanmıştır.

Etil Alkol (%70'lik)

Kimyasallar	100 mL
Etil Alkol (%96)	72,9 mL
Distile Su	27,1 mL

İstenilen miktarda etil alkol üzerine distile su eklenerek hazırlanmıştır.

Feulgen Boyasının Hazırlanması

Feulgen boyası, çalışmalarda (örn; kromozom sayımı için kök uçarında ya da yaprak ve tomurcuklardaki bitki dokularında) çoğunlukla kullanılan bir boyadır. Çalışmamızda, preparatların hazırlanması sırasında feulgen boyası tercih edilmiştir.

Feulgen boyası, protokole [150] uygun bir şekilde aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Hazırlanışı: 1 g kristal halinde fuksin bazik (parafuksin) alınmıştır. Yaklaşık 10 cm çapında saat camı veya küçük bir havanda ezilmiştir. 500 cm³'lük bir erlenmayerin dip kısmına toz halindeki bazik fuksin, kabın çevresine bulaştırmadan konulmuştur. Farklı bir erlenmayerde ise 200 cm³'lük damıtık su kaynatılıp; kaynamış damıtık su toz halindeki fuksin bazik üzerine yavaşça dökülmüştür. Bir yandan cam çubuk ile boya devamlı olarak karıştırılmıştır. Boyanın sıcaklığı 50 °C oluncaya kadar karıştırmaya devam edilmiştir. Boya üzerine 20 cm³ 1N HCl ilave edilmiştir. Oluşan karışım filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür. Süzölen boya içerisine 2 g potasyum metabisülfid (K₂S₂O₅) ilave edilip ağzı kapaklı bir şişeye alınmıştır. Işık almayan bir ortamda en az bir gece olmak üzere 24 saat kadar dolapta bekletilmiştir. Vişneçürüğü renginden açık çay rengine dönen boya daha sonraki kullanımlar için 4 °C'de muhafaza edilmiştir [150].

4.2. Metot

4.2.1. Allium Testi

4.2.1.1. Büyüme Engelleme Testi

Allium test bir maddenin mitotik indeks ve kromozom yapısı üzerine etkisini belirlemek için yapılmaktadır. 2-KP'nin sitogenetik etkilerinin incelenmesinde kullanılacak dozları belirlemek amacıyla büyüme engelleme testi yapılmıştır. Bunun için önce EC₅₀ değeri belirlenmiştir. EC₅₀ değerini belirlemek için aynı büyüklükteki soğanlar (1-2 cm çapında) alınıp dış kabukları çıkarılmış ve kök primordialarına zarar vermeyecek şekilde çimlenmiş olan köklerinden temizlenmiştir. 2-KP'nin 5, 10, 25, 50, 100, 200 ve 400 ppm'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon ve kontrol grubunda 5'er adet soğan kullanılmıştır. Oda sıcaklığında (~21 °C±4 °C) dört gün çimlendirilen soğanlardan her bir konsantrasyon ve kontrol grubu için aynı soğan yumrusundan en iyi filizlenmiş 10'ar adet kök alınarak ortalama kök uzunlukları bulunmuştur. Çözeltiler her gün yenilenmiştir. EC₅₀ değerini belirlemek için kök uçlarının büyümesini negatif kontrol grubuna göre %50 azaltan doz esas alınmıştır. Uygulama dozlarının belirlenmesinde ½xEC₅₀ (25 ppm), EC₅₀ (50 ppm) ve 2xEC₅₀ (100 ppm) değerleri kullanılmıştır. *Allium cepa*'nın hücre döngüsü 24 saat olduğu için uygulama süresi 24, 48, 72 ve 96 saat olarak belirlenmiştir. *A. cepa* kök uçlarına 2-KP'nin yukarıda verilen konsantrasyonlarını belirlenen sürelerde uygulamak için, her bir konsantrasyon için 6'şar soğan iki gün süre boyunca saf suda çimlenmeye bırakılmıştır. En iyi köklenen 5 tane soğan her bir konsantrasyon için kullanılmıştır ve her gün verilecek konsantrasyonlar değiştirilmiştir. Bütün kök uçları aynı gün sabah saat 8³⁰'da alınmıştır. Bütün uygulamalardan sonra alınan kök uçları ayrı ayrı tüplere alınarak absolüt alkol: glasiyal asetik asit (3:1) fiksatif içerisinde buzdolabında bir gece bekletilerek tespit edilmiştir. Daha sonra kök uçları %70'lik alkol içerisine alınarak 4 °C'de buzdolabında depolanmıştır. Kök uçları, Mİ ve mitoz bölünme sırasında oluşan anormallikleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

4.2.1.2. Feulgen Tekniği İle Preparatların Hazırlanması

Kök uçları buldukları %70'lik alkolden çıkartılıp bir tüp içerisine alınarak üzerine 1-2 mL 1N HCl çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra 60 °C'deki su banyosunda 8-10 dakika bekletildikten sonra iki defa 5'er dakika distile suda bekletilerek HCl'nin etkisi seyreltilmiştir. Kök uçları Feulgen boyası içerisine alınarak oda sıcaklığında karanlık ortamda 20-30 dakika boyanmaya bırakılmıştır. Kök uçlarının koyu boyanan kısımları 1-2 mm uzunluğunda kesilerek bir lamın üzerine 1 damla %45'lik glasiyel asetik asit konularak jilette parçalanmıştır. Daha sonra üstleri lamelle kapatılarak ezme preparatları hazırlanmıştır. Preparatları yarı daimi hale getirmek için lamellerin etrafı tırnak cilası ile kapatılmıştır. Kök ucu meristem hücrelerine ait mitotik indeksin belirlenmesinde, her uygulama için hazırlanan 5 preparatın her birinde 1000'in üzerinde hücre olmak üzere toplam yaklaşık 5000-6000 hücre içinde mitoz giren hücreler sayılmıştır. (Mİ=Mitoza girmiş hücre sayısı/Toplam hücre sayısı ×100) [151].

Mitotik indeks hesaplamalarından sonra, preparatların incelenmesine yeniden başlanmış ve bu sefer kromozom aberasyonları her preparatta 100 anafaz veya telofaz hücresi olmak üzere her uygulamada toplam 500 anafaz veya telofaz hücresi incelenerek belirlenmiştir. Mitotik anormallikler saptanarak en sık görülen anormalliklerin fotoğrafları x40 objektifte çekilmiştir [11].

4.2.2. Komet Testi

Bu metot, izole edilen DNA içeren tek hücrelerin DNA'larının lam üzerinde hazırlanan agar jel içerisinde elektroforetik ortamda yürütülmesi ve hasar seviyesine göre göç eden farklı yük ve moleköl ağırlıklarına sahip DNA parçalarının DNA spesifik floresan boya ile boyandıktan sonra, floresan mikroskop altında değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

- 1) Gerekli sayıda soğan 48 saat süre ile distile suda köklendirilmiştir.
- 2) 48. saatin sonunda soğanlar önceden hazırlanan konsantrasyonlara alınmış kök uzamaları belli sürelerle devam ettirilmiştir (24, 48, 72 ve 96 saat).
- 3) En geç 1 saat önceden cam petri kablari, jiletler ve filtre buzlukta bekletilmiştir.

- 4) Gerekli sayıda lam, ısıtıcı tabla üzerinde (50-60 °C) ısıtılmıştır.
- 5) %1'lik NMPA hazırlanarak ısıtılan lamaların üzerlerine 90-100 µL yayılarak oda ısısında dehidre edilmiştir. Süresi dolan soğanlardan her konsantrasyon için her bir soğandan yedişer kök kesilmiştir.
- 6) Cam petri kapının içine alınan kökler üzerine soğuk nükleus izolasyon tamponundan (pH 7,5) 600 µL ilave edilecek ve bir jilet yardımıyla mekanik olarak doğranmıştır.
- 7) Nükleus içeren tampon pipet yardımıyla filtreden geçirilerek ependorf tüpe alınmıştır.
- 8) Bu işlem sırasıyla tüm konsantrasyonlar için uygulanmıştır.
- 9) İçerisinde örneklerin bulunduğu ependorflar 1200 rpm'de 7 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- 10) Pelet kısmı DNA hasarının belirlenmesinde kullanılmışken, süpernatant kısmı miktar tayininde kullanılmıştır.
- 11) Bu sırada %1,5'lik LMPA hazırlanmış ve 55 °C'de tutulmuştur.
- 12) 50 µL örnek, 50 µL LMPA ile karıştırılıp önceden hazırlanan lamaların üzerlerine yayılmıştır.
- 13) Üzerleri lamelle kapatılarak buz kasetlerinin üzerinde 3-5 dakika bekletilmiştir.
- 14) 3-5 dakikanın sonunda jeller donmuş olacak ve lameller yavaşça çekilerek alınmıştır.
- 15) Örnekler elektroforez tankına alınacak, elektroforez tampon çözeltisi (pH>13) içinde cihaz çalıştırılmadan +4 °C'de 25 dakika bekletilmiştir. Ardından 25 V, 20 dakika, 300 mA'de yürütülmüştür.
- 16) İşlem sonunda preparatlar +4 °C'de 5 dakika distile su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra nötralizasyon tamponuyla +4 °C'de 5 dakika aralar ile 3'er kez nötralize edilmiştir.
- 17) Her preparat için 70 µL etidyum bromür ile boyama yapılmış ve +4 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra boyanın fazlası soğuk distile su ile akıtılmıştır.
- 18) Lamelle üzerleri kapatılarak mikroskop aşamasına geçilmiştir. Her lamda 50 hücre floresan mikroskopunda değerlendirilmiştir. DNA hasar derecesi görsel skorlama (0-4) ile belirlenmiştir.

50 Komet (50 komet/slayt), bir floresan mikroskobu kullanılarak beş sınıftan birine (0-hasarsız, 1-hafif hasar, 2-orta hasar, 3-ciddi hasar, 4-tam hasar) ait olarak görsel olarak puanlanmıştır [152]. Böylece, Komet için toplam skor 0 (tüm hasarsız) ve 200 (tüm hasarlı) arasında olabilir.

DNA hasarının derecesi ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

$$\text{Arbitrary unit} = \sum_{i=0}^4 Ni * i$$

Ni = I derecesindeki hücrelerin sayısı; i = hasar derecesi (0, 1, 2, 3, 4)

4.2.3. *A. cepa* Kök Meristem Hücrelerinde 2-KP Tayini (LC-MS/MS)

Kütle spektrometresi, analiz edilen örneğin iyonlaştırılması, ve buharlaştırılması ile oluşan, iyonların kütle/yük (m/z veya m/e) değerlerine göre ayrılarak sağlayan bir cihazdır.

Kütle spektrometrisi, uçucu bileşenler içermeyen test maddelerinin analizi için sıvı kromatografi ile birleştirilmiştir. Madde karışımı ya da madde uygun solvanlarda çözüldükten sonra cihaza yerleştirilir. Numunedeki her bir maddenin yüksek basınçlı sıvı kromatografi kısmında ayrılarak kütle spektrometresi bölümüne gelir ve her bir maddenin ayrı ayrı kütle spektrumu elde edilerek analiz gerçekleştirilir. Pek çok modern kütle spektrometrede bilgisayar destekli tarama kütüphaneleri vardır. Bilgisayarda yüklü spektrumlar, numunenin kütle spektrumu ile karşılaştırılarak teşhis amacıyla kullanılabilir.

Kütle spektrometrisinde amaç; Elektron bombardımanı ile oluşan artı yüklü parçacıkların kütle/yük (m/e) değerinin bağıl bolluklarına göre grafiğe geçirilmesiyle Kütle Spektrumu'nu oluşturarak molekülün yapısını tayin etmektir.

A. cepa kök uçlarında toplam 2-KP miktarını belirlemek için LC-MS/MS (çift pompa sistemi, soğutma sistemi, sütun fırını ve otomatik örnekleme sistemi ile donatılmış bir Agilent 1200 serisi UPLC) kullanılmıştır. 6460 Kütle Spektrometrik Üçlü Quadrapole LC-MS/MS sistemi ile işlem gerçekleştirilmiştir. Üçlü Quadrapole kütle spektrometresi, bir elektrosprey jet akımı iyonizasyon kaynak sistemi ile donatılmıştır. MS/MS sistemini çalıştırmak için çoklu reaksiyon izleme modu kullanılmıştır.

Analistlerin kromatografik ayrılması için Zorbax Eclipse plus C18 (2,1 x 50 mm-1,8) kolon kullanılmıştır. Mobil faz, su içinde %0,1 formik asit, %70 (mobil faz A) ve %30 asetonitrilde (mobil faz B), 40 °C kolon sıcaklığına sahip 1,2 mL/dakikalık bir toplam akış hızında yapılmıştır. 3,129 dk izokratik elüsyon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.3’de kütle spektrometresi koşulları verilmiştir. Aşağıdaki MRM geçişleri gözlemlenmiştir:

$$m / z 114 \rightarrow 77,9 \text{ ve } 114 \rightarrow 51,1$$

Çizelge 4.3. Kütle spektrometresi koşulları

Genel Ayarlar	Değerler	Analiz Parametreleri	Değerler
Gaz Sıcaklığı	325 °C	Ana Kütle	114 g/mol
Gaz Akış Hızı	11 L/dk	Tanınma Ürünleri Kütleleri	77,9-51 g/mol
Püskürtme Basıncı	45 psi	Kütle İzleme Süresi	45 ms
Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı	400 °C	Çarpışma Enerjisi	30 eV
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	12 L/dk	Alıkonma Süresi	3,205 dk

4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Sonuçlar SPSS 23.0 for Windows paket programında, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan çoklu dağılım testi ile saptanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Doz cevap ilişkisi Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Büyüme Engelleme Testi

Büyüme engelleme testi 2-KP'nin EC_{50} değerinin belirlenmesi için yapılmıştır. 2-KP'nin 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 ppm'lik konsantrasyonları ve saf su (negatif kontrol) 96 saat boyunca çimlenmeye bırakılmıştır (Resim 5.1). Süre sonunda her bir uygulama için en iyi çimlenmiş 10 kök alınarak (toplamda 50 kök) ortalama kök uzunluğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.1). Çözeltiler her gün yenilenmiştir.



Resim 5.1. 2-KP'nin büyüme engelleme testi

Kontrol grubuna göre ortalama kök uzunluğunu %50 azaltan doz EC₅₀ değerini vermektedir. Çalışmamızda negatif kontrol grubunda çimlenmeye bırakılan soğanların ortalama kök uzunluğu 3,81 cm olarak tespit edilmiş ve EC₅₀ değerinin belirlenmesinde 3,81 cm'nin yarısı olan 1,905 cm ya da bu değere yaklaşık olan büyüme araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında 50 ppm'lik çözelti içerisinde bulunan kök uçlarının ortalama uzunluğu 1,94 cm (Büyüme oranı %50,92) olarak belirlenmiş ve bu değer negatif kontrol grubundaki soğanların ortalama kök uzunluğunun yarısı olan 1,905 cm'ye en yakın değer olduğu görülmüştür. Buna göre 2-KP'nin EC₅₀ değeri yaklaşık olarak 50 ppm olarak belirlenmiştir. 2-KP'nin uygulanan bütün dozları ortalama kök uzunluğunu doza bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak azaltmıştır (r=-0,975 p=0,01). 100 ppm'lik uygulamada kontrol grubuna göre %64,57 oranında azalma tespit edilmiştir. 400 ppm'lik uygulamalarda ise kontrol grubuna göre büyümede %87,54 oranında azalma görülmüştür.

Çizelge 5.1. 2-KP'nin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde konsantrasyonuna bağlı olarak ortalama kök uzunlukları

Dozlar (ppm)	Ortalama uzunluk cm±SS*	% Büyüme	% Büyümede azalma
Kontrol	3,81±0,21a	100	0
5	2,97±0,16b	77,95	22,05
10	2,72±0,16c	71,39	28,61
25	2,38±0,1d	62,47	37,53
50	1,94±0,12e	50,92	49,08
100	1,35±0,1f	35,43	64,57
200	0,89±0,11g	23,36	76,64
400	0,37±0,1h	12,46	87,54

*Sütunlardaki farklı küçük harfler p< 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)

SS: Standart sapma

5.2. 2-Kloropiridin'in Mitotik İndeks Üzerine Etkisi

2-KP'nin *A. cepa* kök meristematik hücrelerde Mİ ve mitotik fazlar üzerindeki etkisi Çizelge 5.2'de gösterilmiştir. Tüm 2-KP dozları Mİ'yı önemli ölçüde azaltılmıştır. Bu azalışlar hem doza bağlı (24 saat için $r=-0,968$ $p=0,01$, 48 saat için $r=-0,974$ $p=0,01$, 72 saat için $r=-0,933$ $p=0,01$ ve 96 saat için $r=-0,944$ $p=0,01$) hem de zamana bağlı olarak (25 ppm için $r=-0,989$ $p=0,01$, 50 ppm için $r=-0,974$ $p=0,01$ ve 100 ppm için $r=-0,949$ $p=0,01$) istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

2-KP'nin Mİ değerlerine bakıldığında en düşük değer 96 saatlik uygulamadaki 100 ppm'lik konsantrasyonda ($47,35\pm 0,57$), en yüksek değer ise 24 saatlik uygulamadaki 25 ppm'lik konsantrasyonda ($62,15\pm 0,29$) görülmüştür. Mİ'nin bu inhibisyonu, 2-KP'nin potansiyel olarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. 2-KP'nin 100 ppm'deki Mİ değerleri MMS'ten daha düşük olduğu bulunmuş olup, sadece 72 saatlik uygulama istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

2-KP mitotik faz frekanslarını değişik şekillerde etkilemiştir. 2-KP, profaz frekansını 48 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik derişiminde arttırmış olup, 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik derişimi hariç 2-KP'nin diğer uygulamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaltmıştır.

2-KP metafaz frekansını kontrol grubuna göre azaltmış olup, 72 saatlik uygulama hariç diğer uygulamalardaki azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 2-KP anafaz frekansını kontrol grubuna göre azalışlar ve artışlar şeklinde etkilemiş olup, bu değişiklikler 96 saatlik uygulamanın 50 ve 100 ppm'lik derişimleri hariç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 2-KP telofaz frekansını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttırmış olup, en yüksek telofaz frekansına 24 saatlik uygulamanın 50 ppm'lik derişiminde ($10,09\pm 0,21$) rastlanılmışken, en düşük telofaz frekansı ise 72 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik derişimde ($7,26\pm 0,33$) rastlanılmıştır.

Çizelge 5.2. 2-KP'nin *A. cepa* kök hücrelerindeki mitotik indeks ve mitotik fazlara olan etkisi

Konsantrasyon (ppm)	Sayılan Hücre	Mitotik İndeks ± SS	Mitotik Faz Safhaları (%) ± SS*			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol- 24 saat	5084	71,54±0,57a	89,30±0,46a	1,90±0,12a	2,37±0,21a	6,43±0,26a
MMS-10	5119	56,83±0,76b	88,04±0,61b	2,86±0,27b	2,58±0,26ab	6,53±0,31a
25	5123	62,15±0,29c	85,39±0,31c	2,54±0,19c	2,67±0,23b	9,39±0,21b
50	5123	58,6±0,35d	84,65±0,37d	2,56±0,23c	2,7±0,14b	10,09±0,21c
100	5081	56,84±0,55b	85,49±0,24c	2,49±0,18c	2,84±0,16b	9,18±0,24b
Kontrol- 48 saat	5114	70,91±0,51a	88,58±0,24ab	2,40±0,14a	2,65±0,19a	6,37±0,23a
MMS-10	5094	54,26±0,66b	88,25±0,36bc	2,37±0,16ab	2,84±0,13a	6,54±0,28a
25	5076	58,02±0,6c	86,45±0,21d	2,21±0,17bc	2,72±0,17a	8,62±0,16b
50	5107	54,59±0,64d	87,90±0,34c	2,09±0,08c	2,31±0,14b	7,70±0,19c
100	5084	51,6±0,77b	88,83±0,26a	1,82±0,11d	2,01±0,11c	7,33±0,18d
Kontrol-72 saat	5098	69,50±0,7a	88,94±0,31a	2,12±0,09a	2,43±0,11a	6,52±0,25a
MMS-10	5085	50,58±0,42b	88,76±0,28a	2,10±0,15a	2,76±0,15b	6,38±0,33a
25	5177	54,27±0,92c	87,94±0,22b	2,09±0,16a	2,38±0,1b	7,59±0,36b
50	5092	50,37±0,83b	88,09±0,13b	2,01±0,09a	2,29±0,21bc	7,62±0,16b
100	5105	48,57±0,77d	88,67±0,4a	1,98±0,17a	2,1±0,2c	7,26±0,33b
Kontrol- 96 saat	5074	70,77±0,59a	89±0,38a	2,23±0,12a	2,53±0,16ab	6,24±0,24a
MMS-10	5083	47,5±0,79b	88,07±0,1b7	2,03±0,18ab	2,57±0,2a	7,33±0,31b
25	5087	51,17±0,57c	88,32±0,54bc	1,88±0,18b	2,38±0,2ab	7,41±0,39b
50	5094	48,78±0,53d	88,25±0,28bc	1,97±0,19b	2,25±0,18bc	7,52±0,34b
100	5089	47,35±0,57b	88,74±0,31ac	1,89±0,17b	2,10±0,25c	7,28±0,18b

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma

5.3. 2-Kloropiridin'in Neden Olduğu Kromozomal Anormallikler

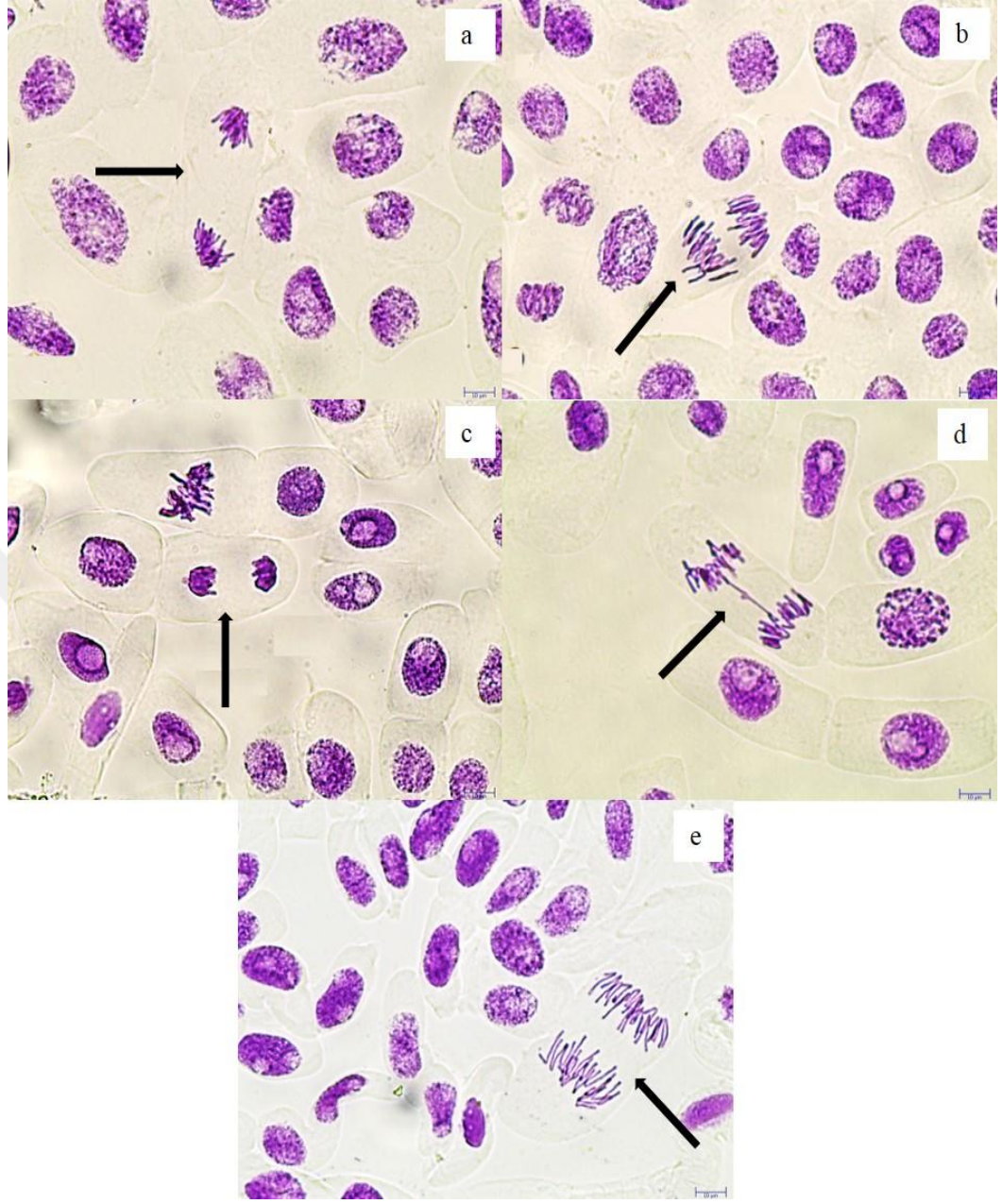
2-KP'nin etkisi ile meydana gelen anafaz-telofaz hücrelerindeki anormalliklerin çeşitleri ve oranları Çizelge 5.3'te ve Resim 5.2'de belirtilmiştir. 2-KP tarafından oluşturulan toplam anormalliklere bakıldığında en fazla anormallik 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%16,4±0,89), en az anormallik olayına ise 24 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik dozunda (%9,20±0,45) rastlanılmıştır. Uygulanan süre ve artan dozlara göre toplam anormallik kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Toplam KA'ların konsantrasyonun (24 saat p=0,829 r=0,01, 48 saat p=0,89 r=0,01, 72 saat p=0,791 r=0,01 ve 96 saat p=0,882 r=0,01 için) ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir (25 ppm için r=0,979 p=0,01, 50 ppm için r=0,934 p=0,01 ve 100 ppm için r= 0,929 p=0,01). Ancak toplam anormallikler pozitif kontrol grubu olan MMS'den düşük bulunmuştur.

Farklı süre ve dozlarda uygulanan 2-KP'nin *A. cepa* kök uçlarında meydana getirdiği ve anafaz-telofaz safhasında görülen anormallikler bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık ve anafaz köprüsüdür. 2-KP'nin uyardığı en fazla görülen anormallik kalgın kromozom iken (%4, 100 ppm, 96 saat), en az görülen anormallik ise anafaz köprüsüdür (%0,4, 25-100 ppm, 24 saat).

Çizelge 5.3. *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde 2-KP'nin neden olduğu kromozomal anormallikler

Konsantrasyon (ppm)	İncelenen Hücre Sayısı	Anafaz-telofazdaki Anormallikler (%)					Toplam Anormallikler (%± SS)
		Bozulmuş anafaz-telofaz	Kalın kromozom	Yapışkanlık	Anafaz köprüsü	Poliploidi	
Kontrol- 24 saat	500	1	0,6	0,8	0,6	0,6	3,60±0,55a
MMS-10	500	2,4	3,2	2,8	3,4	2	13,8±0,84b
25	500	2,6	2,8	2,6	0,8	0,4	9,20±0,45c
50	500	2,8	2,6	3	1,4	0,8	10,60±0,55d
100	500	2	3,4	3,4	2,2	0,4	11,40±0,89d
Kontrol- 48 saat	500	0,6	1	0,6	0,8	0,2	3,20±0,45a
MMS-10	500	2,8	3	3,2	3,2	2,2	14,4±0,89b
25	500	2,6	2,6	2,6	1,8	0,8	10,40±0,55c
50	500	2,8	2,6	2,6	2,4	1,2	11,60±0,55d
100	500	2,6	3	2,8	3	1,6	13,00±0,71e
Kontrol-72 saat	500	1,4	1,2	0,6	0,8	0,2	4,20±0,45a
MMS-10	500	3	3,2	4	3,2	2,6	16,00±0,71b
25	500	2,8	3	3,2	2,4	1,2	12,60±0,55c
50	500	3	2,8	3,2	3,2	1,4	13,60±0,89d
100	500	3,2	3,2	3,4	3,2	1,8	14,8±0,84e
Kontrol- 96 saat	500	0,6	1,2	0,4	1	0,2	3,40±0,55a
MMS-10	500	3,6	3,4	4,2	3,6	2,4	17,20±0,45b
25	500	2,4	3,2	3,6	2,6	1,6	13,40±0,55c
50	500	3,4	3,4	3,6	3,2	1,4	15,00±0,71d
100	500	3,4	4	3,8	3,6	1,4	16,4±0,89b

* Her bir uygulamadaki aynı sütun içerisindeki farklı harfler p<0,05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi) SS: Standart Sapma



Resim 5.2. 2-KP'ye maruz bırakılmış *A. cepa* kök hücrelerinde görülen anafaz-telofaz anormallikleri a: Bozulmuş anafaz-telofaz, b: Kalgın kromozom, c: Yapışkanlık, d: Anafaz köprüsü, e: Poliploidi

2-KP'nin oluşturduğu anormalliklere bakıldığında doz ve sürelerde bozulmuş anafaz-telofaz (Şekil 5.3a) oranının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Bozulmuş anafaz-telofaza en fazla 96 saatlik sürenin 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonunda (%3,4), en az ise 24 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%2) rastlanılmıştır.

Bir diğer anormallik olan kalgın kromozom (Şekil 5.3b) olayına en fazla 96 saatlik sürenin 100 ppm'lik konsantrasyonunda (%4), en az ise 24 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik dozunda (%2,6) rastlanılmıştır.

Yapışkanlık olayına ise en fazla 96 saatlik uygulama süresinin 100 ppm'lik dozunda (%3,8) rastlanılmıştır. En az yapışkanlık ise 24 saatlik uygulama süresinin 25 ppm'lik dozu ile 48 saatlik uygulama süresinin 25-50 ppm'lik dozunda (%2,6) görülmüştür (Şekil 5.3c).

2-KP'nin neden olduğu anormalliklerden biri anafaz köprüsüdür (Şekil 5.3d). En az 25 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (%0,8), en fazla olarak da 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%3,6) görülmüştür.

2-KP'nin neden olduğu anormalliklerden biride poliploididir (Şekil 5.3e). Poliploidi en çok 100 ppm'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (%1,8), en az ise 25 ve 100 ppm'lik dozların 24 saatlik uygulamasında %0,4 olarak tespit edilmiştir.

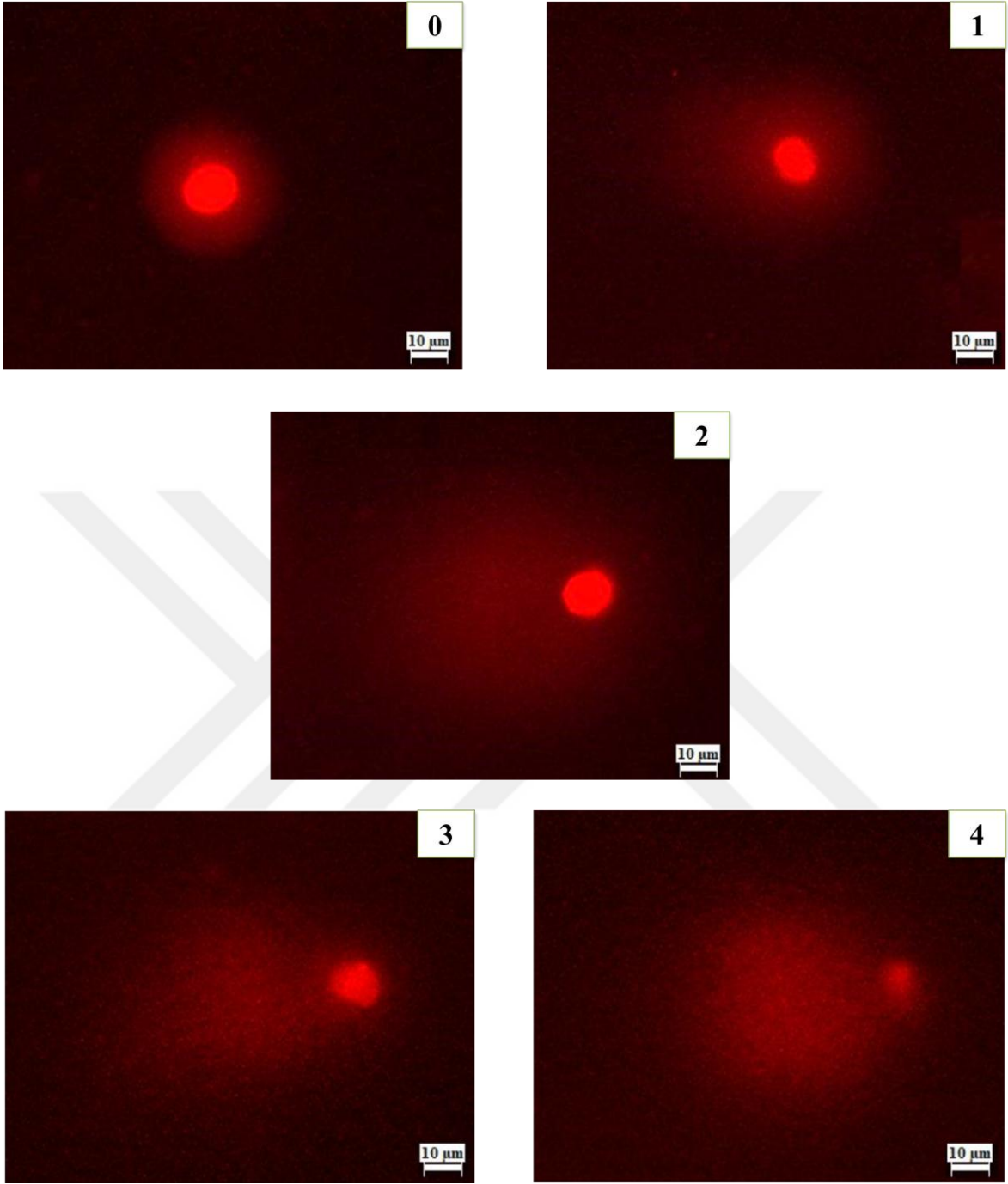
5.4. Allium Komet Testine Ait Bulgular

2-KP'nin *A. cepa* kök meristematik hücreleri üzerinde oluşturduğu DNA hasarı 24-96 saat arasında Komet testi ile tespit edilmiştir (Çizelge 5.4). 2-KP'nin uygulanan bütün dozları DNA hasarını kontrol grubuna göre, zamana (25 ppm için $r=0,85$ $p=0,01$, 50 ppm için $r=0,896$ $p=0,01$ ve 100 ppm için $r=0,934$ $p=0,01$) ve doza bağımlı olarak istatistiksel olarak arttırmıştır (24 saat için $p=0,938$ $r=0,01$, 48 için saat $p=0,89$ $r=0,01$, 72 saat için $p=0,897$ $r=0,01$ ve 96 saat için $p=0,977$ $r=0,01$). 2-KP'nin neden olduğu DNA hasarı $100,67\pm 3,06$ ile $148,67\pm 1,57$ arasında değişmiştir. Ancak bu değerler MMS'ten düşük bulunmuştur. 2-KP'nin oluşturduğu en yüksek hasar değeri 100 ppm'lik dozun 96 saatlik uygulamasında ($148,67\pm 1,53$) ve en düşük hasar değeri 25 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında ($100,67\pm 3,06$) rastlanılmıştır. Şekil 5.1'de Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. 2-KP'nin *A. cepa* kök meristematik hücrelerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)			
		Ortalama \pm Standart sapma			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	-	4,33 \pm 0,58a	3,67 \pm 0,58a	6,33 \pm 0,58a	4,67 \pm 1,15a
MMS	10	146,33 \pm 2,31b	151,33 \pm 1,53b	155 \pm 1,73b	158,67 \pm 2,52b
	25	100,67 \pm 3,06c	127 \pm 2,65c	129,67 \pm 2,08c	132,33 \pm 1,15c
2-Kloropiridin	50	107,33 \pm 2,08d	130,67 \pm 1,53c	135,67 \pm 3,21d	139,33 \pm 2,08d
	100	130,67 \pm 2,89e	137,67 \pm 3,21d	140 \pm 2e	148,67 \pm 1,53e

* Aynı sütun içerisindeki farklı harfler $p<0,05$ düzeyinde önemli (Duncan çoklu dağılım testi)
SS: Standart Sapma



Şekil 5.1. Komet testi ile farklı düzeylerde hasarlı DNA görüntüleri 0: Hasarsız, 1: Hafif hasar, 2: Orta hasar, 3: Ciddi hasar, 4: Tam hasar

5.5. 2-Kloropiridin'in LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

LC-MS/MS ile *A. cepa* köklerinde 2-KP'nin kantitatif analizi Çizelge 5.5'da gösterilmektedir. 2-KP'nin *A. cepa* köklerine geçen miktarı hem doz (24 saat için $r=0,886$ $p=0,01$, 48 saat için $r=0,977$ $p=0,01$, 72 saat için $r=0,984$ $p=0,01$ ve 96 saat için $r=0,984$ $p=0,01$) hem de süreye bağımlı olarak artmış olup bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (25 ppm için $r=0,923$ $p=0,01$, 50 ppm için $r=0,908$ $p=0,01$ ve 100 ppm için $r=0,948$ $p=0,001$). Kontrol ve MMS grubunda 2-KP'ye rastlanılmamış olup, 2-KP'nin en düşük miktarına 24 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik derişiminde ($0,109\pm0,006$ ppb), en yüksek miktarına ise 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik derişiminde ($0,291\pm0,007$) rastlanılmıştır.

Çizelge 5.5. 2-KP'nin *A. cepa* kök meristem hücrelerinde LC-MS / MS ile kantitatif analizi

Uygulama	Konsantrasyon (ppm)	Miktar (ppb \pm SD)*			
		24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Kontrol	-	-	-	-	-
MMS	10	-	-	-	-
2-Kloropiridin	25	0,109 \pm 0,006a	0,138 \pm 0,005a	0,148 \pm 0,007a	0,164 \pm 0,01a
	50	0,121 \pm 0,005b	0,187 \pm 0,004b	0,196 \pm 0,008b	0,215 \pm 0,006b
	100	0,129 \pm 0,002c	0,227 \pm 0,013c	0,253 \pm 0,009c	0,291 \pm 0,007c

* Aynı harfli ortalamalar 0,05 düzeyinde istatistiksel olarak farklı değildir; ppb: milyar başına parça; SD: Standart Sapma

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

2-KP, doğal olarak oluşmayan bir çevresel kirleticidir. İmidaklopid gibi pestisitlerin, kozmetiklerin ve piriton içeren biyositler gibi diğer farmasötiklerin ara ürünleri olarak oluşmaktadır. Ayrıca antihistamin ilaç, feniramin, antiaritmik ve disopiramit üretiminde bir başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Ayrıca iz element olarak akarsular, kirlenmiş sularda ve atık sularda tanımlanmıştır [50, 51, 152]. Birçok kullanım alanında yaygın olmasına rağmen, 2-KP toksisitesi ile ilgili çok az çalışma vardır.

Birçok bitki türü (*Crepis capillaris*, *Hordeum vulgare*, *Pisum sativum*, *Tradescantia sp.*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Lycopersicum esculentum*, *Arabidopsis thaliana* ve *Allium cepa*) kimyasalların sitotoksik etkilerini belirlemek için sıkça tercih edilmektedir. Bu test sistemlerinden biri olan *Allium* testi ilk defa 1938 yılında Levan [119] tarafından kolşisin etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu temel test sistemine belirli modifikasyonlar yapılarak kullanım alanı geliştirilmiştir [10]. Bu test sisteminde makroskobik parametreler (büyüme, EC_{50}) ve mikroskobik parametreler (mitoz, c-mitoz, kalgın kromozom, yapışiklilik, anafaz-telofaz bozuklukları, poliploidi gibi) çok kolay bir şekilde değerlendirilebilmektedir. Ayrıca bu testin sonuçları diğer test sistemleriyle iyi bir korelasyon göstermektedir [10, 11, 153-156, 157-162].

2-KP'nin yaklaşık olarak bulunan EC_{50} değerinin sonunda uygulama dozlarını belirlemek için EC_{50} değerinin, $2xEC_{50}$, EC_{50} ve $\frac{1}{2}xEC_{50}$ değerleri kullanılmıştır. *Allium* kök büyüme inhibisyon testi kullanılarak 2-KP'nin EC_{50} değeri yaklaşık 50 ppm (%50,92) olarak bulunmuştur (Çizelge 5.1). Buna bağlı olarak 2-KP'nin 25, 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Distile su negatif kontrol grubu, MMS'de pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. *A. cepa* hücre siklusunu 24 saat içerisinde tamamladığı için uygulama süresi 24-96 saat olarak seçilmiştir.

2-KP'nin bütün konsantrasyonları ortalama kök uzamasını istatistiksel olarak azaltmış ve bunun yanında kök büyüme değerlerinde doza bağlı bir azalma görülmüştür ($r=-0,975$ $p=0,01$). Genel olarak, kök büyümesinin engellenmesi apikal meristematik aktivite ve farklılaşma esnasında hücre uzamasıyla alakalıdır [163].

Litaretürdeki farklı çalışmalarda 2-KP'nin, 15 dakika Microtox bakteri tahlili ile EC_{50} 1,64 mmol/L olduğu bulunmuştur. Deri uygulamasından veya intraperitoneal enjeksiyondan sonra tavşanlarda 2-KP'nin LD_{50} 'si sırasıyla 64 ve 48 mg/kg bulunmuştur [164]. Oral uygulamadan sonra farede 2-KP'nin LD_{50} 'si 110 mg/kg bulunmuştur. Gastrik kanser hücresi SGC-7901'de 1,3,4-oksadiazol parçasına sahip 2-KP türevlerinin IC_{50} 'sinin $1,61 \pm 0,06$ ile >20 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği bulunmuştur [165].

Tüm 2-KP dozları Mİ'yi önemli ölçüde azaltılmıştır. Mİ'nin bu inhibisyonu, 2-KP'nin potansiyel olarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 5.2). 2-KP'nin 100 ppm'deki Mİ değerlerinin MMS'ten daha düşük olduğu bulundu, ancak 72 saatlik uygulamadaki düşüş sadece istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 2-KP'nin Mİ değerlerine bakıldığında en düşük değer 96 saatlik uygulamadaki 100 ppm'lik konsantrasyonda ($47,35 \pm 0,57$), en yüksek değer ise 24 saatlik uygulamadaki 25 ppm'lik konsantrasyonda ($62,15 \pm 0,29$) görülmüştür. Mİ'nin bu inhibisyonu, 2-KP'nin potansiyel olarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. 2-KP'nin 100 ppm'deki Mİ değerleri MMS'ten daha düşük olduğu bulunmuş olup, sadece 72 saatlik uygulama istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

İncelenen maddenin hücreler üzerindeki mitotik indeks oranını düşürmesi maddenin mitodepresif etki yarattığını ortaya koymaktadır. Madde, interfaz evresine giren hücre yoğunluğunu azaltıp hücre döngüsünün olağan mekanizmasına zarar vermektedir. Mİ'deki belirgin azalma; G_1 fazının durması, DNA sentezinin baskılanması veya S fazındaki DNA sentezinin inhibe edilmesi gibi etki edici [166, 167] veya G_2 fazının engellenmesinden kaynaklanabilmektedir. Mitoza giren hücre [168] veya mitotik faz süresi değişmektedir [169]. Ayrıca hücre döngüsünün spesifik proteinlerinin inhibe edilmesine bağlı olarak, DNA polimerazı ve antimitotik etkiye yol açan diğer enzimleri [170] veya ve ROS homeostazını [171] inhibe eden olası hedef bölge olarak kalabilmektedir. Hücre siklusunun inhibisyonu ile DNA sentezine spesifik olan DNA polimeraz ve çeşitli işlevler için gerekli olan çoğu enzim proteinlerin incelenen maddeye hedef olması ile engellenmektedir.

Mitotik indeksin azalmasındaki diğer bir neden olarakta ATP'nin azalması ve enerji üretiminin engellenmesi gösterilebilmektedir. Bizim sonucumuzun aksine, 2-KP'nin insan lenfositlerinde sitotoksik etki göstermemiştir [172]. 2-KP istatistiksel olarak profaz fazını düşürürken (48 ve 96 saatin 100 ppm'leri hariç), telofaz endeksini arttırmıştır. Profaz fazındaki düşüş, profaz hücrelerinin durmasına bağlı olabilir. Telofaz endeksinin artması mitotik döngüdeki gecikmeden kaynaklanıyor olabilmektedir [173].

2-KP'nin *Saccharomyces cerevisiae*'de neden olduğu mitotik değişim anöploididir [174]. 2-KP, L5178Y fare lenfoma hücrelerinde, metabolik aktivasyon ile veya metabolik aktivasyon olmadan kromozom sapmaları ve mikronükleus oluşumunu indükleyerek klastojenik etki göstermiştir [175]. 100 ug/mL'de 2-KP ile in vitro olarak tedavi edilen insan lenfosit kültürlerinde mikronükleus oluşumu istatistiksel olarak artmıştır, ancak 50 ug/mL'de veya altında genotoksik bulunmamıştır. 2-KP'nin foto-işleminde, 100 ug/mL'de genotoksik ürünler de üretmiştir [1]. Ancak, 2-KP, Afrika Yeşil maymun böbrek hücrelerinde 400 ila 3200 µg/mL doz aralığında sitotoksik ve klastojenik etki göstermemiştir [176]. Mikro çekirdekli normo-kromatik eritrositlerin frekansları, 3 ay boyunca içme suyunda 2-KP'ye (10 ila 1000 ppm) maruz bırakıldıktan sonra farelerde hücrelerinde değişme olmamıştır [177].

Çizelge 5.3'de 2-KP etkisi ile *A. cepa* kök meristem hücreleri üzerinde meydana gelen anafaz-telofaz bozukluklarının (bozulmuş anafaz-telofaz, kalgın kromozom, yapışkanlık, anafaz köprüsü ve poliploidi) sonuçlarını özetlemektedir. Toplam KA'ların konsantrasyonunun (24 saat $p=0,829$ $r=0,01$, 48 saat $p=0,89$ $r=0,01$, 72 saat $p=0,791$ $r=0,01$ ve 96 saat $p=0,882$ $r=0,01$ için) ve zamana bağlı bir artış gözlemlenmiştir (25 ppm için $r=0,979$ $p=0,01$, 50 ppm için $r=0,934$ $p=0,01$ ve 100 ppm için $r=0,929$ $p=0,01$). Uygulanan süre ve artan dozlara göre toplam anormallik kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak toplam anormallikler pozitif kontrol grubu olan MMS'den düşük bulunmuştur. 2-KP tarafından oluşturulan toplam anormalliklere bakıldığında en fazla anormallik 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%16,4±0,89), en az anormallik olayına ise 24 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik dozunda (%9,20±0,45) rastlanılmıştır. Toplam KA'ların konsantrasyonunun zamana bağlı artışı 2-KP'nin genotoksik potansiyelinin olduğunu göstermiştir.

2-KP'nin etkilediği *A. cepa* kök meristem hücrelerinde en fazla görülen anormallik olan kalgın kromozom iken (%4, 100 ppm, 96 saat), en az görülen anormallik ise anafaz köprüsüdür (%0,4, 25-100 ppm, 24 saat).

2-KP'nin oluşturduğu anormalliklere bakıldığında doz ve sürelerde bozulmuş anafaz-telofaz oranının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Bozulmuş anafaz-telofaza en fazla 96 saatlik sürenin 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonunda (%3,4), en az ise 24 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%2) rastlanılmıştır. Bozulmuş anafaz-telofaz ve kalgın kromozom, kutuplara doğru hareket eden kromozomların başarısız olması, iğ yapısının deformasyonundan ya da bozulmuş mikrotübüllerden kaynaklanabilir [155, 139, 178, 179].

Bir diğer anormallik olan kalgın kromozom olayına en fazla 96 saatlik sürenin 100 ppm'lik konsantrasyonunda (%4), en az ise 24 saatlik uygulamanın 25 ppm'lik dozunda (%2,6) rastlanılmıştır. Kalgın kromozomlar da mikronükleus oluşumuna neden olabilmektedir [130]. DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağlanmasına yol açan yapışkanlık, muhtemelen DNA'nın depolimerizasyonundan veya nükleoproteinlerin kısmi çözünmesinden veya kromatin liflerinin kromozomal araya girmesinden kaynaklanabilmektedir [180-182].

Diğer bir anormallik olan yapışkanlık ise yapışkanlık olayına ise en fazla 96 saatlik uygulama süresinin 100 ppm'lik dozunda (%3,8) rastlanılmıştır. Genellikle kromozomlar üzerinde geri dönüşümsüz etkiye sebep olan yapışkanlık ise, artan kromozom kısalması ve yoğunlaşması, muhtemelen DNA'nın depolimerizasyonu ve nükleoproteinlerin kısmi çözünmesinden veya kromatin liflerinin ekstra kromozomal ile iç içe geçmesinden kaynaklanabilir [180-182, 183]. Kromozomlarda yapışkanlık; DNA-DNA veya DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olur [184]. Aynı zamanda yapışkanlık, test edilen bileşiğin toksik olduğunun göstergesi olmakla beraber bu anormalliğin hücre ölümüne neden olduğu da düşünülmektedir [10, 185].

2-KP'nin meydana getirdiği anormalliklerden biri olan anafaz köprüsü, en az 24 saatlik uygulamasının 25 ppm'lik dozunda (%0,8) en fazla olarak da 96 saatlik uygulamanın 100 ppm'lik dozunda (%3,6) görülmüştür.

Anafaz köprüleri, kullanılan kimyasal maddelerin klastojenik etkisi sonucu kromozomların kırılması ya da füzyonu, eşit olmayan kromatid değişimi, disentrik kromozomdan dolayı, replikasyon enzimlerinin aktivasyonunun değiştirilmesinden veya yapışkanlıktan dolayı oluşabilir [168, 186].

2-KP'nin neden olduğu anormalliklerden biride poliploididir. Poliploidi en çok 100 ppm'lik dozun 72 saatlik uygulamasında (%1,8), en az ise 25 ve 100 ppm'lik dozların 24 saatlik uygulamasında (%0,4) olarak tespit edilmiştir. Poliploidiler, fragmoplast oluşumunda zorluklara yol açan sitokinez süreci bozulmasına neden olabilmektedir [128].

Bu araştırma kapsamında, 2-KP'nin genotoksik etkileri Komet Testi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Günümüzde hücrelerde DNA hasar ve tahminini belirleyebilmek için kullanılan bir yöntem olan Komet testi basit, çok yönlü, hızlı, görsel, maliyeti düşük, hassastır [187]. DNA çapraz bağlantıları (örneğin, timidin dimerleri) ve oksidatif DNA hasarı gibi diğer bazı DNA hasar lezyonları, spesifik DNA tamir enzimleri ve lezyon-spesifik antikoları kullanılarak Komet testi ile belirlenebilir. *Allium* testinden farklı olarak *A. cepa* meristematik kök hücreleri aynı zamanda Komet testinde de kullanılmaktadır [188]. Bütün bu avantajlar göz önüne alındığında çalışmamızda Komet testi uygulanmış ve sağlıklı veriler elde edilmiştir.

A. cepa kök meristematik hücreleri üzerinde 2-KP'nin DNA hasarı Komet testi ile 24-96 saat arasında değerlendirilmiştir (Çizelge 5.4). 2-KP ile muamele edilen hücreler, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, 24 saat ($p=0,938$ $r=0,01$), 48 saat ($p=0,89$ $r=0,01$), 72 saat ($p=0,897$ $r=0,01$) ve 96 saat ($p=0,977$ $r=0,01$) boyunca önemli derecede doza bağımlı bir şekilde DNA hasarı göstermiştir. 2-KP'nin neden olduğu DNA hasarı 100,67±3,06 ila 148,67±1,57 arasında değişmiştir. 2-KP'nin oluşturduğu en yüksek hasar değeri 100 ppm'lik dozun 96 saatlik uygulamasında (148,67±1,53) ve en düşük hasar değeri 25 ppm'lik dozun 24 saatlik uygulamasında (100,67±3,06) rastlanılmıştır.

2-KP'nin metabolik aktivasyonlu Ames test sisteminde mutajenik olduğu bulunmuştur [139, 189]. 2-KP ile muamele edilen *Salmonella typhimurium*'un reaktif oksijen türlerine, DNA hasarına ve KA'lara neden olabildiği görülmüştür.

A. cepa kök uçlarında toplam 2-KP miktarını belirlemek için LC-MS/MS (çift pompa sistemi, soğutma sistemi, sütun fırını ve otomatik örnekleyici ile donatılmış bir Agilent 1200 serisi UPLC) cihazı kullanılmıştır. LC-MS/MS ile *A. cepa* köklerinde 2-KP'nin kantitatif analizi Çizelge 5.5'te gösterilmektedir. Her süreye bağlı olarak 2-KP'nin miktarı artmıştır. En düşük 2-KP miktarı, 24 saat 25 ppm'de ($0,109 \pm 0,006$ ppb), en yüksek miktarda ise, 96 saatt 100 ppm'de ($0,109 \pm 0,006$ ppb) elde edilmiştir.

Sonuç olarak endüstriyel atık sularda, su kirletici ve tarım ilaçlarının bir iz organik kimyasal metaboliti olarak bulunan 2-KP'nin, *A. cepa* kök meristem hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi nedeniyle mitotik indekste çok az bir azalmaya neden olmakla beraber KA'larda ve DNA hasarında artışa neden olarak genotoksik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, 2-KP'nin dikkatli bir şekilde uygun dozlarda kullanılması aynı zamanda farklı moleküler test sistemleri ile de araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] Vlastos, D., Skoutelis, C. G., Theodoridis, I. T., Stapleton, D. R. And Papadaki, M. I., 2010, “Genotoxicity study of photolytically treated 2-chloropyridine aqueous solutions”, *J. Hazard. Mater.*, 177 (1-3): 892–898.
- [2] Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J. B. J., Carrière, Y., 2009, “Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data”, *J. Econ. Entomol.*, 102 (6): 2011-2025.
- [3] Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, E. M., Zaugg, S., Barber, L., Buxton, H., 2002, “Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance”, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (6): 1202-1211.
- [4] Wilson, C., Tisdell, C., 2001, “Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs”, *Ecol. Econ.*, 39 (3): 449–462.
- [5] Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Li Puma, G., Malato, S., 2012, “Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO₂ concentrations”, *J. Hazard. Mater.*, 211– 212, 131– 137.
- [6] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T., 2009, “A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal”, *Desalination*, 239 (1-3): 229–246.
- [7] Klamerth, N., Malato, S., Maldonado, M. I., Agüera, A., Fernandez-Alba, A. R., 2010, “Application of photo-Fenton as tertiary treatment of emerging contaminants in municipal wastewater”, *Environ. Sci. Technol.*, 44 (5): 1792–1798.
- [8] Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., 1998, “Jørgensen, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review”, *Chemosphere*, 36 (2): 357–393.

- [9] Grant, W. F., 1982, "Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program", *Mutat. Res.*, 99: 273-291.
- [10] Fiskesjö, G., 1985, "The *Allium* test as a standard in environmental monitoring", *Hereditas*, 102 (1): 99-112.
- [11] Rank, J., Nielsen, M. H., 1994, "Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater", *Mutat. Res.-Envir. Muta.*, 312 (1): 17-24.
- [12] Teixeira, R. D. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S., Vicentini, V. E. P., 2003, "Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays", *Genet. Mol. Biol.*, 26 (4): 551-555.
- [13] Ma, T. H., Cabrera, G. L., Owens, E., 2005, "Genotoxic agents detected by plant bioassays", *Rev. Environ. Health*, 20 (1): 1-14.
- [14] Leme, D. M., Marin-Morales, M. A., 2009, "*Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application", *Mutat. Res.-Rev. Mutat.*, 682 (1): 71-81.
- [15] Kwasniewska, J., Nałęcz-Jawecki, G., Skrzypczak, A., Płaza, G. A., Matejczyk, M., 2012, "An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests", *Ecotox. Environ. Safe.*, 75: 55-62.
- [16] Liman, R., Ciğerci, I. H., Öztürk, N. S., 2015, "Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay", *Pestic. Biochem. Phys.*, 118: 38-42.
- [17] Palmieri, M. J., Andrade-Vieira, L. F., Trento, M. V. C., Eleutério, M. W. F., Lubber, J., Davide, L. C., et al., 2016, "Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*", *Water Air Soil Poll.*, 227: 1-10.
- [18] Küçük, D., Liman, R., 2018, "Cytogenetic and genotoxic effects of 2-chlorophenol on *Allium cepa* L. root meristem cells", *Environ. Sci. Pollut. R.*, 25 (36): 36117-36123.
- [19] Verma, S., Srivastava, A., 2018, "Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L., A biomarker based study", *Chemosphere*, 206: 248-254.

- [20] Seth, C. S., Misra, V., Chauhan, L. K. S., Singh, R. R., 2008, "Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach", *Ecotox. Environ. Safe.*, 71 (3): 711-716.
- [21] Türkoğlu, Ş., 2012, "Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay", *Pestic. Biochem. Phys.*, 103 (3): 224-230.
- [22] Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A., Buttafava, A., Balestrazzi, A., et al., 2013, "Single cell gel electrophoresis (comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing", *Chemosphere*, 92 (1): 1-9.
- [23] Jiang, Z., Qin, R., Zhang, H., Zou, J., Shi, Q., Wang, J., Liu, D., et al., 2014, "Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescent probe, microtubular immunofluorescence and comet assay", *Plant Soil*, 383 (1-2): 357-372.
- [24] Çiğerci, İ. H., Liman, R., Özgül, E., Konuk, M., 2015, "Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests", *Cytotechnology*, 67 (1): 157-163.
- [25] Silveira, G. L., Lima, M. G. F., dos Reis, G. B., Palmieri, M. J., Andrade-Vieria, L. F., 2017, "Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.", *Chemosphere*, 178: 359-367.
- [26] Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Risueño, M. C., Testillano, P. S., 2018, "The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models", *Environ. Pollut.*, 240: 77-86.
- [27] Li, Q. Q., Loganath, A., Chong, Y. S., Tan, J., Obbard, J. P., 2006, "Persistent organic pollutants and adverse health effects in humans", *J. Toxicol. Environ. Health*, 69 (21): 1987-2005.
- [28] Lee, D. H., Lee, I. K., Jin, S. H., Steffes, M., Jacobs, D. R., 2007, "Association between serum concentrations of persistent organic pollutants and insulin resistance among nondiabetic adults: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002", *Diabetes Care*, 30 (1): 622-628.
- [29] Çiçek, N., 2005, "Toprağa Adsorbe Haldeki Karbamatlı Pestisitlerin Güneş Işığı Etkisi Altında Bozunma Süreçlerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, s. 1.

- [30] Erdoğan, B. Y., 2010, “Samsunda Yaygın Olarak kullanılan Pestisitlerin sağlığa ve Çevreye Etkileri”, Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Terme Meslek Yüksek Okulu Gıda İşleme Bölümü, *Alınları Ziraat Bilimler Dergisi*, 19 (2): 28-35.
- [31] Çalışkan, M., 2010, “Sentetik Piretroid Bir İnsektisit Olan Tetromitlerinin Albino Farelerin Serum Proteinleri Üzerine Etkileri”, Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, Ankara, 67 (2): 65-71.
- [32] Fındıklı, Z., Türkoğlu, Ş., 2010, “Glyphos ve DDVP’ nin *Allium cepa L.*’ da Mitoz Bölünme ve Kromozomlar Üzerine Etkisi”, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, *Fen Bilimleri Dergisi*, Sivas, 31 (2): 49-62.
- [33] Demirci, E., 1996, “Fungisitlere Karşı Dayanıklılığın Gelişimi ve Yönetimi”, Atatürk Üniversitesi, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (4): 576-88.
- [34] Akyazı, R., Ecevit, O., 2008, “Phytoseiulus Persimilis Athias- Henriot (Acari Phytoseiidae)’in Laboratuvar Koşullarında Tetranychus Cinnabarinus Boisduval (Acari Tetranychidae)’u Tüketim Kapasitesi ve Bazı Akarisitlerin Bu İki Tür Üzerine Etkileri”, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25 (2): 7-18.
- [35] Çiftcioğlu, G., Issa, G., 2006, “Çevre ve Gıdalardaki Pestisit Kalıntıları”, İstanbul Üniversitesi, *Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32 (3):81-90.
- [36] Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G., 2005, “Tarımsal Savaşmada KullanılanPestisitlerin Yol Actığı Çevre Sorunları”, *VI. Türkiye Ziraat Muhendisliği Teknik Kongresi*, TMMOB Ziraat Muhendisleri Odası, Ankara, 649-665.
- [37] Tiryaki, O., Canhilal, R., Horu, S., 2010, “Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri”, Erciyes Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26 (2): 154-169.
- [38] TÜİK, 2017.
- [39] Monteith, H. D., Parker, W. J., Bell, J. P., Melcer, H., 1995, “Modeling the fate of pesticides in municipal wastewater treatment”, *Wat. Env. Res.*, 67: 964-970.
- [40] Kınık, Ö., Kavas, G., 2002, “Süt ve Süt Ürünlerinde Pestisitler”, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 16: 1-22.
- [41] Yıldırım, E., 2008, “Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve İlaçlar Formunda Pestisitlerin Sınıflandırılması”, Ankara Üniversitesi, *Ziraat Fakültesi Yayınları*, Erzurum, s. 350.

- [42] Anderson, T., 1849, "On the constitution and properties of picoline, a new organic base from coal-tar", *T. Roy. Soc. Edin.-Earth*, 16: 123–136.
- [43] Chichibabin, A. E., 1924, "Über Kondensation der Aldehyde mit Ammoniak zu Pyridinebasen [On condensation of aldehydes with ammonia to make pyridines]", *J. Prakt. Chem.*, 107: 122.
- [44] Buttery, R. G., Seifert, R. M., Guadagni, D. G., Ling, L. C., 1971, "Characterization of Volatile Pyrazine and Pyridine Components of Potato Chips", *J. Agr. Food Chem.*, 19 (5): 969–971.
- [45] Kuney, J. H., 1994, "The Manual of Commercially Available Chemicals, The American Chemical Society", Washington, DC, *Chemyclopedia*, p. 410.
- [46] Stapleton, D. R., Konstantinou, I. K., Hela, D. G., Papadaki, M., 2009, "Photolytic removal and mineralisation of 2-halogenated pyridines", *Water Res.* 43: 3964–3973.
- [47] Stapleton, D. R., Konstantinou, I. K., Karakitsou, A., Hela, D. G., Papadaki, M., 2009, "2- Hydroxypyridine photolytic destruction by 254nm UV irradiation at different conditions", *Chemosphere*, 77: 1099–1105.
- [48] Fent, K., Weston, A., Caminada, D., 2006, "Ecotoxicology of human pharmaceuticals", *Aquat. Toxicol.*, 76: 122–159.
- [49] Konstantinou, I. K., Hela, D. G., Albanis, T. A., 2006, "The state of pesticide pollution in freshwater resources (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels", *Environ. Pollut.*, 141: 555–570.
- [50] Hendricks, A. J., Maas-Diepeveen, J. L., Noordsij, A., Van der Gaag, M. A., 1994, "Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: a major part of the toxic compounds remains unidentified", *Water Res.*, 28: 581–598.
- [51] Guardiola, A., Ventura, F., Matia, L., Caixach, J., Rivera, J., 1991, "Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of volatile organic compounds in Barcelona tap water", *J. Chromatogr.*, 562: 481-492.
- [52] Suchail, S., De Sousa, G., Rahmani, R., Belzunces, L.P., 2004, "In vivo distribution and metabolisation of ¹⁴C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L.", *Pest. Manage. Sci.*, 60: 1056–1062.
- [53] Maton, A., Hopkins, J. J., LaHart, S., Quon, W. D., Wright, M., Jill, D., 1997, "Cells: Building Blocks of Life", *Prentice Hall.*, New Jersey, p. 70–4.

- [54] Kalatova, B., Jesenska, R., Hlinka, D., Dudas, M., 2015, "Tripolar mitosis in human cells and embryos: occurrence, pathophysiology and medical implications", *Acta Histochem.*, 117 (1): 111–25.
- [55] Kops, G. J., Weaver, B. A., Cleveland, D. W., 2005, "On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint", *Nature Reviews. Cancer.*, 5 (10): 773–85.
- [56] De Souza, C. P., Osmani, S. A., 2007, "Mitosis, not just open or closed", *Eukaryot. Cell*, 6 (9): 1521–7.
- [57] Lloyd, C., Chan, J., 2006, "Not so divided: the common basis of plant and animal cell division", *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 7 (2): 147–52.
- [58] Hücre döngüsü.
http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch02/02_05-cell_cycle.jpg 14.6.2010
- [59] Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2009, "Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser", Öner C (Editör), Genetik kavramlar'da, *Palme Yayıncılık*, Ankara, p.434-456.
- [60] Prasanth, K. V., Sacco-Bubulya, P. A., Prasanth, S. G., Spector, D. L., 2003, "Sequential entry of components of the gene expression machinery into daughter nuclei", *Mol. Biol. Cell*, 14 (3): 1043–57.
- [61] Kadauke, S., Blobel, G. A., 2013, "Mitotic bookmarking by transcription factors", *Epigenet. Chromatin*, 6 (1): 6.
- [62] Prescott, D. M., Bender, M. A., 1962, "Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells", *Exp. Cell Res.*, 26 (2): 260–8.
- [63] Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A., Raff, J. W., 2006, "Flies without centrioles", *Cell*, 125 (7): 1375–86.
- [64] Heywood, P., 1978, "Ultrastructure of mitosis in the chloromonadophycean alga *Vacuolaria virescens*", *J. Cell Sci.*, 31: 37–51.
- [65] Ribeiro, K. C., Pereira-Neves, A., Benchimol, M., 2002, "The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads", *Biol. Cell*, 94 (3): 157–72.
- [66] Chan, G. K., Liu, S. T., Yen, T. J., 2005, "Kinetochore structure and function", *Trends Cell Biol.*, 15 (11): 589–98.

- [67] Cheeseman, I. M., Desai, A., 2008, "Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface", *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 9 (1): 33–46.
- [68] Winey, M., Mamay, C. L., O'Toole, E. T., Mastronarde, D. N., Giddings, T. H., McDonald, K. L., McIntosh, J. R., 1995, "Three-dimensional ultrastructural analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle", *J. Cell Biol.*, 129 (6): 1601–15.
- [69] Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E. D., Earnshaw, W. C., 2004, "The dynamic kinetochore-microtubule interface", *J. Cell Sci.*, 117 (23): 5461–77.
- [70] Chan, G. K., Yen, T. J., 2003, "The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit", *Prog. Cell R.*, 5: 431–9.
- [71] FitzHarris, G., 2012, "Anaphase B precedes anaphase A in the mouse egg", *Curr. Biol.*, 22 (5): 437–44.
- [72] Glotzer, M., 2005, "The molecular requirements for cytokinesis", *Science*, 307 (5716): 1735–9.
- [73] Albertson, R., Riggs, B., Sullivan, W., 2005, "Membrane traffic: a driving force in cytokinesis", *Trends Cell Biol.*, 15 (2): 92–101.
- [74] Lilly, M. A., Duronio, R. J., 2005, "New insights into cell cycle control from the *Drosophila* endocycle", *Oncogene*, 24 (17): 2765–75.
- [75] Lindahl, T., 1990, "Repair of intrinsic DNA lesions", *Mutat. Res.*, 238 (3): 305-11.
- [76] Johnson, R. T., Collins, A. R., Squires, S., Mulliner, A. M., Elliot, G. C., Downes, C. S., et al., 1987, "DNA Repair under stress", *J. Cell Sci.*, 6: 263-88.
- [77] Dinçer, Y., Akçay, T., 2000, "DNA damage", *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (2): 73-9.
- [78] Kuru, M., Ergene, S., 2011, "Genetik (Örnek Problemlerle)", *Palme Yayıncılık*, Ankara, 48-266.
- [79] Akı, C., 2002, "Genel Genetik", *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi*, Çanakkale, 46-48.
- [80] Gardner, R. M., Sutherland, G. R. Shaffer, L. G., 2011, "Chromosome abnormalities and genetic counseling" 4th ed., Oxford Monographs on Medical Genetics, *Oxford University Press*, OUP USA, 277-341.

- [81] Debeleç Bütüner, B., Kantarcı, G., 2006, “Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları, ve Kanslerle ilişkisi”, *J. Fac. Pharm.*, 35 (2): 149-70.
- [82] Klug, W. S., Cummings, M. R., 2002, “Genetik Kavramlar”, Altıncı Baskıdan Türkçe çeviri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 477-481.
- [83] Kulaksız, G., Sancar, A., 2007, “Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser”, *Türk Biyokimya Dergisi*, 32 (3): 104-11.
- [84] Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H. E., 2003, “The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage”, *Mutat. Res.*, 531: 231-51.
- [85] Hedge, M. L., Hazra, T. K., Mitra, S., 2008, “Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells”, *Cell Res.*, 18: 27-47.
- [86] Karahalil, B., Hogue, B. A., de Souza-Pinto, N. C., Bohr, V. A., 2002, “Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: Tissue-specific variations”, *Faseb. J.*, 16: 1895-902.
- [87] Hanawalt, P. C., 2002, “Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation”, *Oncogene*, 21: 8949-56.
- [88] Choy, W. N., 2001, “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, *Marcel Dekker*, New York, 29-187.
- [89] Young, R. R., 2002, “Genetic toxicology”, *Toxicology*, 173, 103-21.
- [90] Mortelmans, K., Rupa, S. D., 2004, “Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 56: 379-401.
- [91] Zeiger, E., 2004, “History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 363-71.
- [92] Purchase, I. F. H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J. A., Anderson, D., Lefevre, P. A., Westwood, F. R., 1978, “An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens”, *Brit. J. Cancer*, 37: 873-959.
- [93] Mavournin, H. K., Blakey, H. D., Cimino, C. M., Salamone, F. M., Heddle, A. J., 1990, “The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program”, *Mutat. Res.*, 239: 29-80.

- [94] Ames, B. N., Gurney, E. G., Miller, J. A., Bartsch, H., 1972, "Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens", *P. Natl. Acad. Sci. Usa.*, 69 (11): 3128–32.
- [95] Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E., 1973, "An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens", *P. Natl. Acad. Sci. Usa.*, 70 (3): 782–6.
- [96] McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J., Ames, B. N., 1975, "Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids", *P. Natl. Acad. Sci. Usa.*, 72 (3): 979–83.
- [97] McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B. N., 1975, "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals", *P. Natl. Acad. Sci. Usa.*, 72 (12): 5135–9.
- [98] Ames, B. N., 1979, "Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer", *Science*, 204 (4393): 587–93.
- [99] Prival, M. J., McCoy, E. C., Gutter, B., Rosendranz, H. S., 1977, "Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate: mutagenicity of a widely used flame retardant", *Science*, 195 (4273): 76–8.
- [100] Tubiana, M., 1992, "The carcinogenic effect of exposure to low doses of carcinogens" *Brit. J. Ind. Med.*, 49 (9): 601–5.
- [101] Jenkins, G. J., Doak, S. H., Johnson, G. E., Quick, E., Waters, E. M., Parry, J. M., 2005, "Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?", *Mutagenesis*, 20 (6): 389–98.
- [102] Hakura, A., Suzuki, S., Satoh, T., 1999, "Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test", *Mutat. Res.*, 438 (1): 29–36.
- [103] Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z., 2011, *Tübav Bilim Dergisi*, 4 (3): 221-229.
- [104] Anderson, D., 1988, "Human Biomonitoring", *Mutat. Res.*, 204: 353-541.
- [105] Carrano, A. V. Natarajan, A. T., 1988, "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 204(3): 379-406.

- [106] Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D. And Aitio, A., 2000, "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans", *Mutat. Res.-Rev. Mutat.*, 463 (2): 111-172.
- [107] Savage, J. R. K., 1993, "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", *Env. Mol. Mutagen.*, 22 (4): 198-207.
- [108] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R. J., Knudsen, L. E., Barale, R. And Fucic, A., 2006, "Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 600 (1): 37-45.
- [109] Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., McFee, A. F., Wolff, S. And Wassom, J. S., 1981, "Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program", *Mutat. Res.-Rev Genet.*, 87 (2): 143-188.
- [110] Evans, H. J. And O'Riordan, M. L., 1975, "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", *Mutat. Res.*, 31 (3): 135-148.
- [111] Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. And Shelby, M., 1987, "Mammalian in vivo cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells", *Mutat. Res.*, 189 (2): 157-165.
- [112] Ford, C. E. And Hamerton, J. L., 1956, "A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes", *Stain Technol.*, 31 (6): 247-251.
- [113] Şekeroğlu, V., Atlı-Şekeroğlu, Z., 2011, "Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68 (4): 241-252.
- [114] İkbāl, M., Atasoy, M., Pirim, I., Aliagaoglu, C., Karatay, S., Erdem, T., 2006, "The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behçet's disease with and without HLA-B51", *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 20 (2): 149-52.
- [115] Symington, L.S., Rothstein, R., Lisby, M., 2014, "Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*", *Genetics*, 198 (3): 795-835.

- [116] Luzhna, L., Kathiria, P., Kovalchuk, O., 2013, "Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond", *Epigenomics and Epigenetics*, 4: 131.
- [117] Houk, V. S., 1992, "The genotoxicity of industrial wastes and effluents-a review", *Mutat. Res.*, 277: 91–138.
- [118] Grant, W. F., 1994, "The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens", *Mutat. Res.*, 310: 175–185.
- [119] Levan, A., 1938, "The effect of colchicines in root mitosis in *Allium*", *Hereditas*, 24: 471–486.
- [120] Levan, A., 1945, "Cytological reactions induced by inorganic salt solutions", *Nature*, 156: 751–752.
- [121] Grant, W. F., 1982, "Chromosome aberration assays in *Allium*", *Mutat. Res.*, 99: 273–291.
- [122] Rank, J., Jensen, A. G., Skov, B., Pedersen, L. H., Jensen, K., 1993, "Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test", *Mutat. Res.*, 300: 29–36.
- [123] Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A. And Zhang, H., 1995, "The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants", *Mutat. Res.*, 334: 185–195.
- [124] Rank, J., Nielsen, M. H., 1993, "A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures", *Hereditas*, 18: 49–53.
- [125] Rank, J., 2003, "The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay", *Ekologija*, 10: 38–42.
- [126] Rank, J., Nielsen, M. H., 1994, "Evaluation of the *Allium* anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater", *Mutat. Res.*, 312: 17–24.
- [127] Fatima, R. A., Ahmad, M., 2006, "Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays", *Mutat. Res.*, 609: 81–91.

- [128] Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C., Marin-Morales, M. A., 2007, “Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide”, *Pest. Biochem. Physiol.*, 88: 252–259.
- [129] Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M. And Toman, M. J., 1996, “The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure”, *Mutat. Res.*, 368: 171–179.
- [130] Leme, D. M. And Marin-Morales, M. A., 2008, “Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study”, *Mutat. Res.*, 650: 80–86.
- [131] Ateeq, B., Adul Farrah, M., Ali, M. N., Ahmad, W., 2002, “Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium* rot tip test”, *Mutat. Res.*, 514: 05–113.
- [132] Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, P., Evandri, M. G., 2004, “Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 43: 137–141.
- [133] Akinboro, A., Bakare, A. A., 2007, “Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn.”, *J. Ethnopharmacol.*, 112: 470–475.
- [134] Yi, H., Wu, L., Jiang, L., 2007, “Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay”, *Sci. Total Environ.*, 308: 232–236.
- [135] Carita', R., Marin-Morales, M. A., 2008, “Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes”, *Chemosphere*, 72: 722–725.
- [136] Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemmink, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Water, M. D., Aitio, A., 2000, “IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety”, *Mutat. Res.*, 463: 111–172.
- [137] Rydberg, B. And Johanson, K. J., 1978, “Estimation of single strand breaks in single mammalian cells”, In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. DNA Repair mechanisms. New York, NY: Academic; pp: 465–468.
- [138] Östling, O. And Johanson, K. J., 1984, “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123 (1): 291–298.

- [139] Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. And Schneider, E. L., 1988, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175 (1): 184-191.
- [140] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al., 2000, "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 206-21.
- [141] Pu, X., Wang, Z., Klaunig, J. E., 2015, "Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells", *Curr. Prot. in Toxicol.*, 65 (3-12): 1–11.
- [142] Dikilitaş, M. And Koçyiğit, A., 2010, "Canlılarda Tek Hücre Jel Elektrophorez yöntemi ile DNA hasar analizi" (Teknik Not): Comet analiz yöntemi, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 14 (2): 77-89.
- [143] Møller, P., 2006, "The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures", *Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98 (4): 336–345.
- [144] Belyaev, I. Y., Eriksson, S., Nygren, J., Torudd, J., Harms-Ringdahl, M., 1999, "Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell gel electrophoresis", *B.B.A.-Gen. Subjects*, 1428 (2–3): 348–356.
- [145] Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., 1990, "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay", *Radiat. Res.*, 122 (1): 86–94.
- [146] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., et al., 2000, "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 206-21.
- [147] Hartmann, A., Agurell, E., Beever, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., et al., 2003, "4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, 4th International Comet Assay Workshop", *Mutagenesis*, 18 (1): 45-51.
- [148] McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Méo, M. P., Collins, A., 1993, "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review", *Mutat. Res.*, 288 (1): 47-63.
- [149] Badr, A., İbrahim, A. G., 1987, "Effect of herbicide Glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Alium cepa* and *Vicia faba* root meristems", *Cytologia*, 52 (2): 293-302.

- [150] Elçi, Ş., 1982, "Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri", *Firat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları*, Elazığ, 3: 37-85.
- [151] Saxena, P. N., Chauhan, L. K. S. And Gupta, S. K., 2005, "Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage" *Toxicology*, 216 (2-3): 244-252.
- [152] Rank, J., Lopez, L. C., Nielsen, M. H. And Moretton, J., 2002, "Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two laboratories", *Hereditas*, 136 (1): 13-18.
- [153] Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak C. And Kasab, R., 2003, "Cytological effects of herbicide racer flurochloridone on *Allium cepa*", *Caryologia*, 56 (1): 97-105.
- [154] Evseeva, T. I., Geras'kin, S. A., Shuktomova, I. I. And Taskaev, A. I., 2005, "Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia)", *J. Environ. Radioactiv.*, 80 (1): 59-74.
- [155] Kara, M., Sanda, M. A., And Ateş, A., 1994, "Cytogenetics effect of the insecticide cypermethrin on the root meristems of *Allium cepa* L.", *Turk. J. Biol.*, 18 (4): 323-331.
- [156] Grant, W. F., 1992, "Cytogenetics studies of agricultural chemicals in plants" *Genetic Toxicology an Agricultural Perspective*, R. Fleck and A., Hollaender eds., *Plenum Press*, New York, 335-378.
- [157] Konuk, M., Liman, R., Ciğerci, İ. H., 2007, "Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells", *Pakistan J. Bot.*, 39 (1): 73-79.
- [158] Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y. And Konuk, M., 2010, "Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* Test", *Chemosphere*, 80 (9): 1056-1061.
- [159] Liman, R., Ciğerci, İ. H., Akyıl, D., Eren, Y. And Konuk, M., 2011, "Determination of genotoxicity of fenaminosulf by *Allium* and Comet Tests", *Pestic. Biochem. Phys.*, 99 (1): 61-64.
- [160] De Marco, A., Romanelli, M., Stazi, M. A., Vitagliano, E., 1986, "Introduction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotiactic acid (NTA)", *Mutat. Res.-Genet. Tox.*, 171 (2-3): 145-148.

- [161] Liman, R., Gökçe, U. G., Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M., 2012, "Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *Genistifolia*", *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22 (3): 541-548.
- [162] Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., Dumas-Gaudot, E., Berta, G., 2006, "Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings", *Env. Exp. Bot.*, 58 (1-3): 253-260.
- [163] Gehring, P. J., Torkelson, T. R., Oyen, F., 1967, "A comparison of the lethality of chlorinated pyridines and a study of the acute toxicity of 2-chloropyridine", *Toxicol. Appl. Pharm.*, 11 (2): 361-371.
- [164] Zheng, Q. Z., Zhang, X. M., Xu, Y., Cheng, K., Jiao, Q. C., Zhu, H. L., 2010, "Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of 2-chloropyridine derivatives possessing 1, 3, 4-oxadiazole moiety as potential antitumor agents", *Bioorgan. Med. Chem.*, 18 (22): 7836-7841.
- [165] Sadia, K. B., Vahidy, A. A., 1994, "Cytotoxic effect of herbicide ronstar on meristematic cells of *Allium cepa*, L.", *Pak. J. Bot.*, 26 (1): 69-74.
- [166] Gupta, K., Mishra, K., Srivastava, S., Kumar, A., 2018, "Cytotoxic Assessment of Chromium and Arsenic Using Chromosomal Behavior of Root Meristem in *Allium cepa* L.", *B. Environ. Contam. Tox.*, 100 (6): 803-808.
- [167] El-Ghamery, A. A., El-Nahas, A. L., Mansour, M. M., 2000, "The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*", *Cytologia*, 65: 277-287.
- [168] Chauhan, L. K. S., Gupta, S. K., 2005, "Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*", *Pestic. Biochem. Phys.*, 82 (1): 27-35.
- [169] Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J. A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., 1989, "Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chlorprophan", *Cytobiologie*, 57: 7-14.
- [170] Livanos, P., Galatis, B., Quader, H., Apostolakos, P., 2012, "Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces a typical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*", *Cytoskeleton*, 69: 1-21.

- [171] Evseeva, T., Geras'kin, S. A. And Shuktomova, I. I., 2003, "Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test", *J. Environ. Radioactiv.*, 68 (3): 235-248.
- [172] Rangaswamy, V., Shanthamurthy, K. B., Arekal, G. D., 1981, "Cytological effects of industrial effluent on somatic cells of *Allium cepa*", In: Manna GK, Sinha V (eds), *Pers. Cyto. Gen.*, Hind Asia Publication Delhi, 3: 303-308.
- [173] Zimmermann, F. K., Henning, J. H., Scheel, I., Oehler, M., 1986, "Genetic and anti-tubulin effects induced by pyridine derivatives", *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 163 (1): 23-31.
- [174] Dearfield, K. L., Harrington-Brock, K., Doerr, C. L., Parker, L., Moore, M. M., 1993, "Genotoxicity of three pyridine compounds to L5178Y mouse lymphoma cells", *Mutat. Res. Lett.*, 301 (1): 57-63.
- [175] Anuszewska, E. L., Koziorowska, J. H., 1995, "Role of pyridine N-oxide in the cytotoxicity and genotoxicity of chloropyridines", *Toxicol. In Vitro.*, 9 (2): 91-94.
- [176] Roberts, G. K., 2017, "NTP Technical Report on the Toxicity Studies of o-Chloropyridine (CAS NO. 109- 09-1) Administered Dermally and in Drinking Water to F344/N Rats and B6C3F1/N Mice", *National Toxicology Program Toxicity Report*, 83: 1-133.
- [177] Rajeshwari, A., Roy, B., Chandrasekaran, N. And Mukherjee, A., 2016, "Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test", *Plant Physiol. Bioch.*, 109: 209-219.
- [178] Fiskesjö, G., Levan, A., 1993, "Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium* test", *Atla*, 21: 139-149.
- [179] Patil, B. C., Bhat, G. I., 1992, "A Comparative Study of MH and EMS in The Induction of Chromosomal Aberrations on Lateral Root Meristem in *Clitoria termata* L.", *Cytologia*, 57 (2): 259-264.
- [180] Türkoğlu, Ş., 2015, "Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*", *Toxicol. Ind. Health.*, 31 (9): 792-801.
- [181] El-Ghamery, A. A., Mousa, M. A., 2017, "Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radicle growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L.", *Ann. Agric. Sci.*, 62 (1): 11-21.

- [182] Luo, L. Z., Werner, K. M., Gollin, S. M. And Saunders, W. S., 2004, “Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells”, *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 554 (1): 375–385.
- [183] Amin, A. W., 2002, “Cytotoxicity Testing of Sewage Water Treatment Using *Allium cepa* Chromosome Aberration Assay”, *Pak. J. Biol. Sci.*, 5 (2): 184-188.
- [184] Barbério, A., Voltolini, J. C., Mello, M. L. S., 2011, “Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test”, *Ecotoxicology*, 20 (4): 927–935.
- [185] Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009, “Comet assay: a reliable tool for the assesment of DNA damage in diffrent models”, *Cell Biol. Toxicol.*, 25 (1): 5-32.
- [186] Vlastos, D., Skoutelis, C. G., Theodoridis, I. T., Stapleton, D. R., Papadaki, M. I., 2010, “Genotoxicity study of photolytically treated 2-chloropyridine aqueous solutions”, *J. Hazard. Mater.*, 177 (1-3): 892-898.
- [187] Liman, R., 2013, “Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay”, *Chemosphere*, 93 (2): 269-273.
- [188] Claxton, L. D., Dearfield, K. L., Spanggord, R. J., Riccio, E. S., Mortelmans, K., 1987, “Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome test”, *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.*, 176 (2): 185-198.
- [189] Chlopkiewicz, B., Wojtowicz, M., Marczevska, J., Prokopczyk, D., Koziorowska, J., 1993, “Contribution of N-oxidation and OH radicals to mutagenesis of 2-chloropyridine in *Salmonella typhimurium*”, *Acta Biochim. Pol.*, 40 (1): 57-59.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : PİRDAL, Güller
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 30.03.1995 / İSTANBUL
Medeni hali : Bekar
E-mail : gullerpirdal@hotmail.com

Eğitim

Derece	Bölüm/Program	Bitirdiği Okul	Yıl
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	Halen
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Uşak Üniversitesi	2017
Lise	Fen Bilimleri	Şehit Cengiz Sarıbaş Lisesi	2013

İş Denevimi

İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi – Moleküler Genetik ve Moleküler Sitogenetik Laboratuvarı (Biyolog-Stajyer)

Yabancı Dil

İngilizce

Makaleler

Pirdal, G., Liman, R., 2019, “Cytotoxic and genotoxic assessment of 2-chloropyridine using *Allium cepa* ana-telophase and comet test”, *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32 (2): 1-1.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Güller Pirdal, Recep Liman “Cytogenetic and genotoxic effects of 2-Chloropyridine on *Allium Cepa* L. root meristem cells” 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress, Afyonkarahisar, Turkey, p. 586, 20-22 April 2019.