

**ETOFENPROX'UN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
ÇİN HAMSTERİ OVARYUM HÜCRELERİNDE  
MİKRONÜKLEUS VE KOMET TESTLERİ  
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

**Faysal YILMAZ**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETOFENPROX'UN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ÇİN HAMSTERİ  
OVARYUM HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS VE KOMET TESTLERİ  
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

**Faysal YILMAZ**

Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ / GENEL BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2013

## TEZ ONAYI

Faysal YILMAZ tarafından hazırlanan “Etofenprox’un Genotoksik Etkilerinin Çin Hamsteri Ovaryum Hücrelerinde Mikronükleus ve Komet Testleri Kullanılarak Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji / Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

**Başkan :** Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
İmza

**Üye :** Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
İmza

**Üye :** Doç.Dr. Rahmiye AYDIN  
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi  
Kimya Anabilim Dalı  
İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
**Enstitü Müdürü**  
/ / 2013

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

/ / 2013

**Faysal YILMAZ**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ETOFENPROX'UN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ÇİN HAMSTERİ OVARYUM HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS VE KOMET TESTLERİ KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

**Faysal YILMAZ**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji / Genel Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Bu çalışmada pyrethroid grubu insektisitlerden etofenprox'un in-vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada memeliler için model olarak çin hamsteri ovaryum (CHO) hücre hattı kullanılmıştır. Sitotoksik etkilerin çalışılmasında klonojenik test ve çekirdek bölünme indeksi değerleri kullanılmıştır. Genotoksik etkilerin belirlenmesinde ise sitokinez bloke mikronükleus testi ve komet testi kullanılmıştır. Klonojenik testte hücreler 24 saat süresince çeşitli konsantrasyonlarda (1-1600 mg/mL) teknik formdaki etofenprox'a maruz bırakılmışlardır. Elde edilen veriler ışığında etofenprox'un CHO hücreleri üzerindeki IC50 değeri 302 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu bulguya dayanılarak genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonlar (1, 50, 100, 200, 400 800 µg/mL) belirlenmiştir. 24 saatlik uygulama sonrasında CHO hücrelerinde oluşan mikronükleus frekansları ile komet parametreleri (kuyruk uzunluğu ve oliv kuyruk momenti) hesaplanmıştır. Çalışma sonunda, etofenprox'un yalnızca yüksek konsantrasyonlarda (200, 400 ve 800 µg/mL) genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular etofenprox'un olası çevresel konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Etofenprox, Genotoksik Etki, CHO, Komet, Mikronükleus

**2013, viii + 65 sayfa**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

### **EVALUATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF ETOFENPROX ON CHINESE HAMSTER OVARY CELLS USING THE MICRONUCLEUS TEST AND THE COMET ASSAY**

**Faysal YILMAZ**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology/General Biology

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr Tolga ÇAVAŞ

In the present study, it was aimed to evaluate the in-vitro cytotoxic and genotoxic effects of etofenprox, a synthetic pyrethroid insecticide. In the study, Chinese hamster ovary (CHO) cell line was used as model for mammals. Clonogenic assay and nuclear division index values in assessment of cytotoxicity. To evaluate genotoxicity, the cytokinesis blocked micronucleus test and the comet assay were used. Cells were exposed to serial concentrations of technical grade etofenprox (1-1600 µg/mL) for 24 h. The IC<sub>50</sub> value of etofenprox was determined as 302 µg/mL. Based on this finding, the genotoxicity test concentrations were determined (1, 50, 100, 200, 400 800 µg/mL). Following 24 h treatment, micronucleus frequencies and comet parameters (tail length and olive tail moment) were evaluated on CHO cells. Our findings indicated that etofenprox had genotoxic effects only at the higher concentrations (200, 400 and 800 µg/mL). Our results indicated that etofenprox has no genotoxic effects at possible environmental concentrations.

**Key words:** Etofenprox, Genotoxic Effect, CHO, Comet, Micronucleus

**2013, viii + 65 pages**

## TEŞEKKÜR

Bütün alışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam **Doç. Dr. Tolga ÇAVAŞ**'a,

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarımdan faydalandığım sevgili hocalarım Doç. Dr. Nilüfer İNKİLİ, Arő. Gör. Özgür VATAN, Arő. Gör. Dilek YILMAZ ve Mümin COŞKUN'a,

Deney aőamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşlarım Özgün TEKSOY ve Ümit KUMBIAK 'a

Birlikte eğitim gördüğüm ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Eőime, kıza ve ođluma,

Teőekkürlerimi sunarım...

Faysal YILMAZ

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1 Pestisitlerin Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.2 Pestisitlerin Sınıflandırması .....	4
2.3 Dünyada ve Türkiye’de Pestisit Kullanımı .....	5
2.4 Pestisitlerin Zararları .....	7
2.4.1 Pestisitlerin Ekolojik Etkileri .....	7
2.4.2 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	8
2.4.2.1 Akut Etkiler .....	8
2.4.2.2 Uzun Vadeli Etkiler .....	8
2.5 Çalışmada Kullanılan Pestisitinin Özellikleri .....	9
2.5.1 Piretrinler ve Pretroidler .....	9
2.5.2 Piretrioidlerin Etki Mekanizması .....	10
2.5.3 Piretrioidlerin Toksikolojisi .....	10
2.5.4 Etofenprox .....	13
2.6 Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri .....	17
2.6.1 Klonojenik Test .....	18
2.6.2 Mikronükleus Testi .....	20
2.6.3 Tek Hücre Jel Elektroforez “KOMET” Testi .....	23
3. MATERYAL ve METOT .....	28
3.1 Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler .....	28



3.2 Etofenprox Çözeltisinin Hazırlanması .....	30
3.3 Kullanılan Hücre Hattı (CHO) ve Kültür İşlemleri .....	30
3.4 Deney Grupları.....	31
3.4.1 Kontrol grupları .....	31
3.4.2 Klonojenik Test Grupları .....	32
3.4.3 Genotoksisite Test Grupları .....	32
3.5 Klonojenik Test.....	33
3.6 Sitokinez Bloke Mikronükleus Testi.....	34
3.7 Alkali “KOMET” Testi.....	35
3.8 İstatistik Analizler.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 Etofenprox’un % Hayatta Kalış (Canlılık) Oranına Etkisi .....	39
4.2 Etofenprox’un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi .....	40
4.3 Etofenprox’un Çekirdek Bölünme İndeksi (ÇBİ) Üzerindeki Etkisi .....	41
4.4 Etofenprox’un Komet Oluşumu Üzerindeki Etkisi .....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	53
EK 1.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
ml	Mililitre
mg	Miligram
$\mu\text{g/L}$	Mikrogram / Litre
KCl	Potasyum klorür
M	Molar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
CHO	Çin Hamster Ovaryumu hücre hattı
Cyt-B	Sitokalsin-B
ÇBİ	Çekirdek Bölünme İndeksi
ÇZK	Çift Zincirli DNA Kırığı
MI	Mononükleuslu hücrelerin sayısı
MII	Binükleuslu hücrelerin sayısı
MIII	Trinükleuslu hücrelerin sayısı,
MIV	Tetranükleuslu hücrelerin sayısı
MN	Mikro Nükleus
$\text{IC}_{50}$	%50 'lik İnhibitör Konsantrasyonu
$\text{LD}_{50}$	%50 'lik Letal Doz
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
TZK	Tek Zincirli DNA Kırığı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1</b>	Dünyada pestisit kullanım oranları ..... 6
<b>Şekil 2.2</b>	Türkiyede pestisit kullanım oranları ..... 7
<b>Şekil 2.3.</b>	Preteroidlerin etki mekanizması ..... 13
<b>Şekil 2.4</b>	Etofenproxun kimyasal yapı formülü ( <a href="http://www.who.int/whopes/quality/en/Etofenprox_eval_WHO_july_2007.pdf">http://www.who.int/whopes/quality/en/Etofenprox_eval_WHO_july_2007.pdf</a> , 2013).. 13
<b>Şekil 2.5</b>	Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Şekerlioğlu ve Şekerlioğlu, 2011). ..... 17
<b>Şekil 2.6</b>	Klonojenik testin genel basamakları ..... 19
<b>Şekil 2.7</b>	Mikronükleus ve nükleoplazmik köprü oluşumları (Fenech, 2007).. 20
<b>Şekil 2.8</b>	Sitokalsin-B ilavesi ve MN oluşumları ..... 21
<b>Şekil 2.9</b>	Genotoksik ajan muamelesi akabinde, sitokinezi bloklanmış hücre kültürlerinde ortaya çıkabilecek çeşitli sonuçlar (Fenech, 2007)... 21
<b>Şekil 2.10</b>	Sitokalsin-B ile bloklanmış MN testi ile sayılmış hücrelere ait mikrograflar. .... 22
<b>Şekil 2.11</b>	KOMET testi aşamaları (Tice ve ark. 2000). .... 24
<b>Şekil 2.12</b>	Komet hücre parametreleri..... 26
<b>Şekil 4.1</b>	Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayata kalış oranları.. 39
<b>Şekil 4.2</b>	Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%) (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) ..... 41
<b>Şekil 4.3</b>	Sitokalsin-B ile muamele edilmiş CHO hücrelerinde çeşitli nükleus formasyonları. a) Binükleat, b) MN'li Binükleat (Büyütme x1.000).. 42
<b>Şekil 4.4</b>	Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde Çekirdek Bölünme İndeksi ÇBİ değerleri (*p<0.05, **p<0.01)..... 43
<b>Şekil 4.5</b>	KAMERAM programı ile Komet değerlerinin belirlenmesi..... 43
<b>Şekil 4.6</b>	CHO hücrelerinde komet oluşumları a) hasarsız DNA b) az hasarlıDNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA (Büyütme x400). .... 44
<b>Şekil 4.8</b>	Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde komet testi ile belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (K: Kontrol, SK: Solvent Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001..... 45
<b>Şekil 4.9</b>	Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde komet testi ile belirlenen ortalama Olive kuyruk momenti değerleri (K: Kontrol, SK: Solvent Kontrol, PK: Pozitif Kontrol) * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 ..... 45

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1</b> Pretroitlerin sıçanlardaki akut oral ve dermal LD <sub>50</sub> değerleri (WHO, 2005).....	10
<b>Çizelge 2.2</b> Pretroitlerin genotoksisitesine ait yapılmış çalışmalar ve sonuçları .....	12
<b>Çizelge 2.3</b> Etofenprox'un uluslararası tanımlama verileri ve kullanım alanları (Montgomery, 1995) .....	14
<b>Çizelge 2.4</b> Etofenprox ile yapılan genotoksisite test sonuçları.....	16
<b>Çizelge 2.5</b> Komet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri (Ünal, 1998) .....	17
<b>Çizelge 3.1</b> Çalışmalarda kullanılan ekipman .....	27
<b>Çizelge 3.2</b> Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler.....	28
<b>Çizelge 3.3</b> Doz deney grupları.....	29
<b>Çizelge 3.4</b> Çeşitli konsantrasyonlarda etofenproxa maruz bırakılan CHO hücrelerindeki mikronükleus frekans tablosu.....	40
<b>Çizelge 3.5</b> Çeşitli konsantrasyonlarda etofenproxa maruz bırakılan CHO hücrelerindeki ÇBİ değerleri .....	42
<b>Çizelge 3.6</b> Çeşitli konsantrasyonlarda etofenproxa maruz bırakılan CHO hücrelerindeki komet testine ait Ortalama Kuyruk Uzunluğu ve Olive Kuyruk Momenti değerleri.....	44

## 1. GİRİŞ

Biyotik çevremizi oluşturan organizmalardan bazıları çeşitli yollarla insanlara yarar sağlamakla birlikte, bir kısmı da zararlı etkilere yol açabilmektedir. Zararlı organizmaların kontrol altında tutulması için uygulanan en yaygın yöntemlerden birisi de pestisit adı verilen kimyasalların kullanımudur.

Aralarında piretroidlerin de bulunduğu birçok pestisit, özellikle genetik materyal DNA üzerinde genotoksik etkilere yol açabileceği gösterilmiştir (Gonzalez, 2011). Genetik materyalde meydana gelebilecek hasarlar onarılamadıkları durumlarda üretkenlik kaybından, kansere, direkt ölümden popülasyon dinamiği bozulmalarına varan geniş etkilere yol açabilmektedirler. Bu nedenle potansiyel etkileri bilinmeyen ajanların genotoksik etkilerinin tespit edilmesi doğal çevre ve sağlık açısından büyük önem taşımaktadır (Li Chen ve ark., 2009)

Bu çalışmada kullanılmak üzere seçilen pestisit etofenprox yaygın bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte Etofenprox'un genotoksik etkileri ile ilgili yapılan literatür çalışmaları yetersiz olup rapor halinde bildirilmiş yalnızca dört sunuma ve son dönemlerde yayınlanan bir makaleye rastlanabilmektedir. 1985 yılında yürütülen bu sunumlarda etofenprox'un genotoksik etkileri bakteri suşlarında ames testi, insan lenfositlerinde kromozom aberasyonu, fare kemik iliğinde mikronükleus ve HeLa hücrelerinde programlanmamış DNA sentezi kullanılarak çalışılmış ve tüm deneylerde negatif sonuç elde edildiği bildirilmiştir (Bootman ve ark., 1985; Foster, 1985; Seeberg ve ark., 1985). Ancak 27 yıl sonra yani 2012 yılına ait olan araştırmada ise etofenprox'un karsinojenik etkileri Hojo ve arkadaşları (2012) tarafından çalışılmış ve yayınladıkları makalede etofenprox'un sıçan karaciğerlerinde ROS'a bağlı tümör oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Etofenprox'un kimyasal yapısı incelendiğinde benzil eklentisi içerdiği görülmektedir. Benzil türevlerinin genotoksik etkileri gösterilmiş olup (Demir ve ark., 2008), özellikle bu yapının etofenprox'a genotoksik potansiyeli kazandırabileceği düşünülebilir (Hayashi ve ark., 2010).

Bu çalışmanın amacı sentetik piretroid insektisitlerden olan Etofenprox'un in-vitro genotoksik etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla Çin hamster ovaryum (CHO) hücreleri seçilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox'a maruz bırakılacak CHO hücrelerindeki genetik hasarlar, ilk kez DNA hasarlarını belirlemede daha uygun bir teknik olan komet testi ve ayrıca sitokinez bloke mikronükleus testi ile incelenerek çok daha hassas biçimde belirleme hedefi, tez çalışmamızın özgünlüğünü oluşturmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 Pestisitlerin Tanımı ve Tarihçesi

Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlardır. Pestisit, kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan, antimikrobik, dezenfektan ya da herhangi bir araç olabilir ([http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what\\_pesticide](http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what_pesticide), 2013).

Pestisitlerin insanlar tarafından kullanılmaları yüzlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Mısır'da haşerelere karşı kükürt ve arsenik içerikli pestisit hazırlandığına ve kullanıldığına dair M.Ö. 1500 yıllarına ait bir papirüste kayıtlar bulunmuştur (Klassen ve ark., 2001) . M.Ö. 1300'de "Mineral yağ" develerde uyuz hastalığı için kullanılan bir çeşit pestisittir. Kutsal tuz veya zafer elde edilmiş savaş meydanı külleri M.Ö 1200'lerde seçici olmayan herbisitler olarak kullanıldığı, M.Ö. 1000 yıllarında Çinlilerin günümüzde hala kullanılan sülfürün fuminat formlarını geliştirdikleri de bilinmektedir (Ware, 1980; Dağlıoğlu, 2004).

"Hellabore" (*Helleborus niger*, *Helleborus orientalis* ve *Veratrum album*) adlı bitki grubunun rodentlere ve böceklere karşı M.Ö. 100'lere dayanan bir geçmişi vardır. Tütün ekstraktlarının M.S. 1690'da kontak insektisit olarak, dumanlarının ise M.S. 1773'te fumigant olarak kullanıldığı literatürde yeralmaktadır (Ware, 1980; Worthing, 1987).

Sanayi devrimiyle birlikte 1940'lardan itibaren doğal yapılı bileşikler yerini daha kararlı ve düşük maliyetli sentetik bileşiklere bırakmıştır (Uslu ve Türkman, 1987; Becker ve ark., 2010). II. Dünya Savaşı'nda Naziler tarafından kimyasal silah olarak kullanılan organik yapıdaki pestisitlerin üretimi ve kullanımı savaş sonrası silah endüstrisinden sivil endüstriye kayarak, üretim ve uygulamaları giderek yaygınlaşmıştır (Klassen ve ark., 2001 ; Dağlıoğlu, 2004).

Pestisitler daha sonraki yıllarda şehir yaşamında da kullanılmaya başlanmış, çeşitli böceklerin uzaklaştırılmasında, çim alanlarındaki yabancı ot ve zararlı hayvanların kontrolünde, yüzme havuzlarındaki alglerin kontrolünde, fare ve sıçanların

öldürülmesinde, evcil hayvanlar için pire tozu olarak, kamp alanlarında sinek ve sivrisinek ile mücadelede kullanılmaya başlanmıştır (Sezer, 2002, Becker ve ark., 2010, Beseler ve ark., 2008).

Pestisitler; kemiriciler, böcekler ve diğer pestleri yok ederler, ayrıca bu hayvanlarla taşınan vektör hastalıklara karşı savaşta da kullanılırlar. Malarya (sıtma), veba, sarıhumma, tifüs bu hastalıklar arasındadır (Ağar, 1990). Tarımda kullanılmaları ile gittikçe artan nüfusa karşı zaten yetersiz olan tarım ürünlerini pestlerden korumaktadırlar. Böylece diğer ve çok önemli bir sağlık sorununa (açlık) karşı savaşta kullanılmakla ayrıca büyük ekonomik yarar sağlamaktadırlar (EPA, 1987; Saito, 1987). Tarım dışında pestisitler kırsal alanlarda (ormanlarda); karayollarında yabani otlara karşı; sivrisinek ve rodentlere karşı resmi kuruluşlar tarafından kullanılmaktadır (FAO, 1985). Ayrıca kişisel olarak evlerde ve bahçe işlerinde de geniş ölçüde uygulanmaktadırlar (Bulut ve Tamer, 1996).

## 2.2 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler aşağıda gösterildiği üzere çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır.

- Fiziksel yapı
- Etkilediği canlı grubu
- Kullanım tekniği
- Formülasyon
- İçerdiği aktif madde grubu
- Zehirlilik derecesi

Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma şekilleri ise kullandıkları zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmalardır (Öncüler 1995).

Etkilediği canlı grubuna göre pestisitler (Toros ve ark. 1999) ;

- İnsektisit: Böcek, haşerelere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Fungisit: Funguslara (Mantar) karşı kullanılan ilaçlardır.
- Herbisit: Yabancı otlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Mollusit: Yumuşakçalara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Rodentisit: Kemirgenlere karşı kullanılan ilaçlardır.
- Nematisit: Nematotlara karşı kullanılan ilaçlardır.
- Akarisit: Akarlara karşı kullanılan ilaçlardır.



İçerdiği aktif madde grubuna göre pestisitler (Korkmaz ve ark., 2011)

- Doğal ve sentetik pretroidlerdir
- Anilin türevleri
- Karbamatlar
- Klorofenoksi bileşikleri
- Organoklorinli bileşikler
- Organofosforlu bileşikler
- Pridin ve Pirimidin türevleri
- Triazinler
- Üre içiren bileşikler
- Sınıflandırılmamış bileşikler

### 2.3 Dünya ve Türkiye’de Pestisit Kullanımı

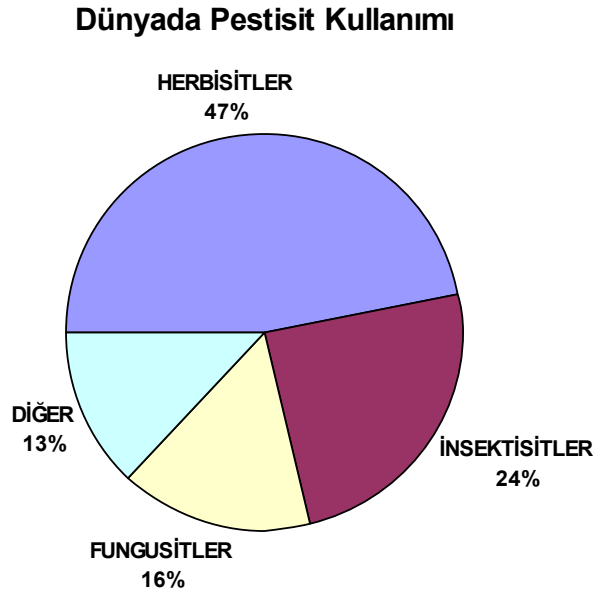
Sentetik kimyasalların yoğun bir şekilde bitki sağlığı alanında kullanılmaya başlamasıyla, bunların insan, çevre ve hayvan sağlığı açısından risklerinin de dolayısıyla arttığı gözlenmiştir. Ülkeler düzeyinde pestisit kullanımı kontrol altına alabilmek için yasal düzenlemeler (ruhsatlandırma sistemleri, imhaları, taşınmaları v.b.) getirilirken, uluslararası düzeyde faaliyet gösteren kuruluşlar da bu alana eğilmişlerdir. Bugün EPPO, FAO, WHO, EEC ve EPA gibi pek çok kuruluş pestisitlerin güvenli kullanımını konusunda azami gayret göstermektedirler (Sevil ve ark., 1991).

Özellikle 1970 yılında başlayan çevre koruma hareketlerinden sonra bütün dünyada pestisit kullanımının çok kontrollü yapıldığı, mevcut ve etkili maddelerin güvenlik testlerine alındığı ve bu değerlendirmeler sonucunda bazı pestisitlerin çeşitli ülkelerde yasaklandığı, kısıtlandığı veya kontrollü bir şekilde kullanımının yapıldığı bilinmektedir (FAO, 1989).

Türkiye’de de ülke menfaatleri dikkate alınarak ruhsatlı pestisitler, araştırma sonuçlarının ışığı altında değerlendirmeye tabi tutulmaktadır. Bu konudan yapılan çalışmalar sonucu bazı pestisitlerin kullanımlarının yasaklanması ve ruhsatlarının iptali; bazılarının ise kısıtlanması veya kontrollü kullanım kararı alınmıştır (Bulut ve Tamer, 1996).

Araştırmalar ışığında pestisitlerle ilgili olarak alınan bu yasaklama ve kısıtlama kararları ile ruhsatlandırma esaslarında o ülkenin fayda/risk analizindeki dengenin ve önceliklerinin etkisi büyük olmaktadır. Örneğin, ileri tarım tekniklerine sahip bir ülkede tehlike altında olan bir kuş türüne zararlı olan bir pestisite ruhsat verilmezken, daha az gelişmiş bir ülkede aynı bileşik izin alabilmektedir (Sevil ve ark., 1991).

Dünyada Pestisitlerin kullanım yüzdeleri herbisitler % 47, insektisitler % 29, fungusitler %19 ve diğer pestisit grupları ise % 5'lik paya sahiptirler. Kullanımın % 76'sını Herbisitler ve insektisitler kapsamaktadır (Şekil 2.1) (Dağ ve ark.2000).

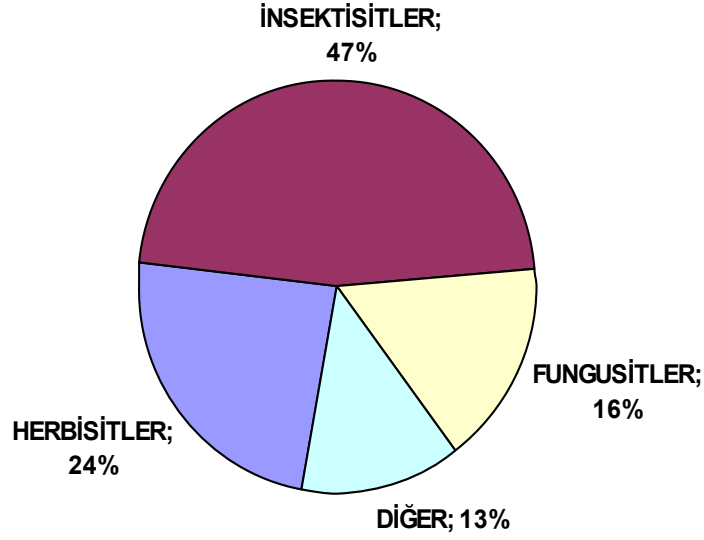


**Şekil 2.1** Dünyada pestisit kullanım oranları (Dağ ve ark.2000).

Türkiye’de biyosidal tüketimi ortalama 33.000 tondur. Bu miktarın % 47’sini insektisitler, %24’ünü herbisitler, % 16’sını fungusitler , % 13’ ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır (Şekil 2.2) (Turabi 2007).

AB mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle, 01.01.2009 tarihi itibariyle 75 adet, 31.08.2009 tarihi itibariyle de 49 adet pestisit imalatı ve ithalatı durdurulmuştur (<ftp://ftp.kkgm.gov.tr/AB/Genel/>, 2011). Şu anda AB’de kullanımdan kaldırılan, ama Türkiye’de hala piyasada olan 101 etkili madde kalmıştır (Tiryaki ve ark. 2010).

## Türkiyede Pestisit Kullanımı



Şekil 2.2 Türkiye’de pestisit kullanım oranları (Turabi 2007).

### 2.4 Pestisitlerin Zararları

Stockholm Kalıcı Organik Kirleticiler Kongresine göre en tehlikeli ve kalıcı 12 kimyasaldan 10’u pestisitlerdir (Anonim, 2009). Bu yönüyle dünyadaki bütün canlılar bitkiler, hayvanlar pestisitlerden etkilenir. ABD deki bir yasada pestisitlerden "ekonomik zehirler" olarak tanımlanmaktadır (Robert ve ark. 1992).

#### 2.4.1 Pestisitlerin Ekotoksikolojik Etkileri

Pestisitler ikincil metabolitlere parçalanmadan ortamda kalmaları ve bu miktarların sürekli birikimi sonucu canlılar üzerinde akut, sub-akut ve kronik zehirlenmelere neden olmaktadır. Bu zehirlenmelerin sonucunda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler de gözlenebilir. Bunun yanında ileriye yönelik kestirilemeyen olumsuz sonuçların doğacağı beklenilmektedir (Vural, 2005). Pestisitlerin bilinçsiz olarak kullanımı sonucunda, ilk kullanıldığı andaki etkili sonucu alabilmek için daha sonraki uygulamalarda arttırılan kullanım miktarı veya daha etkin kimyasalların kullanımına

gerek duyulması beklenen faydanın tersi bir sonuç ortaya koymaktadır (Delen ve ark., 2005).

Ayrıca pestisitlerin kullanımı ile çeşitli canlıların ortamdan uzaklaştırılmasıyla, bu canlılar ile beslenen diğer canlılarında olumsuz etkilenmelerine yol açarak besin zincirinde kırılmalara neden olmaktadır (Soykan, 2007).

## **2.4.2 Pestisitlerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri**

Pestisitlerin insan sağlığına olan etkileri akut veya uzun süreli olabilir. (Anonim 2007)

### **2.4.2.1 Akut etkiler**

Akut problemler sıklıkla pestisiti hazırlayan işçilerde göğüs ağrısı, baş dönmesi, baş ağrısı, burun akıntısı, kusma gibi belirtiler yanında deri ve gözde tahrişlenmelere neden olur (Klaassen ve Doull 1996). Pretrinler sıklıkla kullanılan böcek öldürücüler olup, solunumla alındığında ölümcül olabilmektedir (Blair ve ark., 1995).

### **2.4.2.2 Uzun vadeli etkiler**

#### *Kanser*

Bir çok çalışma pestisit maruziyeti ve kanser riski üzerine yapılmış olup lökomiya, lenfoma, beyin, böbrek, göğüs, prostat, karaciğer, akciğer ve deri kanserleri ile ilişkilendirilmiştir (Gilden ve ark. 2010). Pestisiti uygulayan tarım işçilerinde artan bir kanser oranı tespit edilmiştir (McCauley ve ark. 2006). Hamilelik esnasında oluşan maruziyet ile çocukta lökomiya, Wilm tümörü ve beyin kanseri görülme riski arasında bağlantı belirlenmiştir (Van Maele-Fabry ve ark. 2010).

#### *Nörolojik*

Pestisit maruziyetinin gittikçe kötüleşen nörolojik süreçlere sebebiyeti üzerine güçlü deliller vardır (Sanborn ve ark. 2007). Parkinson hastalığı oluşum riski, az miktarlarda dahi pestisite maruz kalan kimselerde %70 daha fazladır (Ascherio ve ark. 2007). Parkinsonlu insanların %61'i direk pestisit maruziyetlerini rapor etmişlerdir. İnsektisit

ve herbisitler Parkinson hastalığı gelişim riskini anlamlı olarak artırmaktadır (Anonim 2008). Ayrıca uzun süreli maruziyetlerin bunama riskini de artırdığına dair şüpheler vardır(Baldi ve ark. 2010).

### *Üremeye etkiler*

Kusurlu doğum, ölü doğum ve kusurlu fetüs gelişimi ile pestisit maruziyeti arasındaki ilişkiye ait güçlü deliller mevcuttur(Sanborn ve ark. 2007). Bunun yanı sıra Garcia ve arkadaşları (1998), pestisitlere maruz kalan ana-babaların çocuklarında, doğuştan gelen bozukluk (teratojenik etki) riskinin arttığını bildirmişlerdir.

### *Diğer kalıcı etkileri*

Erkeklerde kısırlık (Sheiner ve ark. 2003). Solunum sorunları, hafıza kayıpları, depresyon (Beseler ve ark. 2003). Diabet (Montgomery ve ark. 2003)

## **2.5 Çalışmada Kullanılan Pestisit Özelliği**

Etofenprox kullanım alanına göre bir insektisit olup, içerdiği aktif madde grubuna göre ise piretrinlerin sentetik formu olan pretroidlerdendir.

### **2.5.1 Piretrinler ve Pretroidler**

Piretrinler daha çok Avusturalya ve Afrika'da bulunan kasımpatı bitkisi çiçeklerinden elde edilen organik bir insektisittir. Nörolojik işlevleri etkileyerek hedefteki zararlı böceği felce uğratar ve bu şekilde öldürürler. Pretroidler sentetik kimyasal insektisitler olup pretrinlere benzer kimyasal taşırlar ve organizmada aynı etkiyi gösterirler (Barbee, 2009). Pretroidlerin gün ışığındaki dayanıklılıkları artırılmıştır. Ürünün biyosidal özelliklerini artırmak amacıyla piretrinlerin çoğu ve bazı pretroid ürünleri sinerjitlerle formüle edilmiştir. Bu sinerjitlerin tek başlarına biyosidal etkileri olmayıp diğer kimyasalları güçlendirmek içindir (<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>, 2012).

### 2.5.2 Pretroitlerin Etki Mekanizması

Yağda çözünme özellikleri sayesinde insekt kütikulasından hızla emilerek toksik etkilerini gösterirler. Aksonik zehirlerdir ve nöral zarlara ait sodyum kanallarını açık tutarak felce neden olurlar ( Şekil 2.3). Pretroidlerin hedef organizmadaki enzimler tarafından metabolize edilmesii engellemek üzere genellikle piperonil bütoksit adlı mikozomal bir oksidaz enzimi inhibitörü ile kullanırlar (Soderlund ve ark., 2002).

### 2.5.3 Pretroitlerin Toksikolojisi

Tarımda kullanımlarının yanında pretroitler halk sağlığı programında da çok önemli rol oynamaktadır. Dünyada yıllık olarak 520 ton aktif pretroit içeriği vektör kontrol amaçlı olarak kullanılmaktadır (Zaim ve Jambulingam, 2004). Pretroitlerin memelilerde de benzer bir etki mekanizmasına sahip olduğu düşünüldüğünde toksikolojik etkilerinin çalışılmasının önemi ortaya çıkar (Soderlund ve ark., 2002).

#### *Akut oral ve dermal toksisite*

Akut oral ve dermal toksisite LD<sub>50</sub> bilgileri IPCS tarafından 2002 yılında aşağıdaki şekilde raporlanmıştır (WHO, 2005). LD<sub>50</sub> değerleri mg/kg/vücut ağırlığı (va) olarak belirtilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Pretroitlerin sıçanlardaki akut oral ve dermal LD<sub>50</sub> değerleri (WHO, 2005).

Bileşik	Oral toksisite Sıçan LD <sub>50</sub> (mg/kg/va)	Dermal toksisite Sıçan LD <sub>50</sub> (mg/kg/va)
Cypermethrin	79	> 1000
Bifenthrin	55	> 2000
Cyfluthrin	254	> 5000
Deltamethrin	135	> 2900
D-phenothrin	> 10000	> 10000
Etofenprox	> 10000	> 2140
Cyhalothrin	56	632
Permethrin	500	> 2000

### *Kısa dönem toksisite*

Pretraitlerin kısa dönem hedefi sinir sistemidir. Kritik etki olarak felce uğratma veya sinir doku tahribatıdır. Aşağıda sıçanlarla yapılan testler sonucu elde edilen veriler, bazı örnekler çerçevesinde, WHO (2005) raporundan derlenerek özetlenmiştir.

#### Deltamethrin:

Oral en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL) 2000 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük

Dermal en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL) 1000 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük

#### Cyfluthrin:

Solukta en düşük etkisizlik konsantrasyonu 47 mg/m<sup>3</sup>  
(NOAEC)

### *Üreme toksisite*

Pretraitler çiftleşme kapasitesi ve fertilité üzerinde tam bir etkiye sahip olduğu söylenemez. Sadece çok yüksek konsantrasyonlarda bu toksik etkiler gözlemlenebilmiştir. 250 mg/kg/gün olarak belirlenen dozlarla beslenen diři sıçanlarda fertilité problemleri belirlenmiştir. Deltamethrin (4 mg/kg/va/gün) ile yapılan tavşan, fare ve sıçanlarda bile herhangi bir teratojenik, gamet kalite bozukluğu ve fertilité problemi tespit edilememiştir (WHO, 2005).

### *Nörotoksisite*

Pretraitlerin hedef yapısı nöronlar olduğundan bu konu ile alakalı birçok pretraitin nörotoksisitesi çalışılmıştır. Genel olarak elde edilen verilere göre akut ve subakut etkilere ait miktarlar arasında farklar mevcuttur (Soderlund ve ark., 2002).

Akut nörotoksisite 4 hafta sonunda 10 mg/kg ile 300 mg/kg arasında başlangıç belirtileri gözlemlenmiştir.

Subakut nörotoksisite 4 hafta sonunda 29 mg/kg ile 170 mg/kg 0 mg/kg arasında başlangıç belirtileri gözlemlenmiştir.

## Genotoksisite

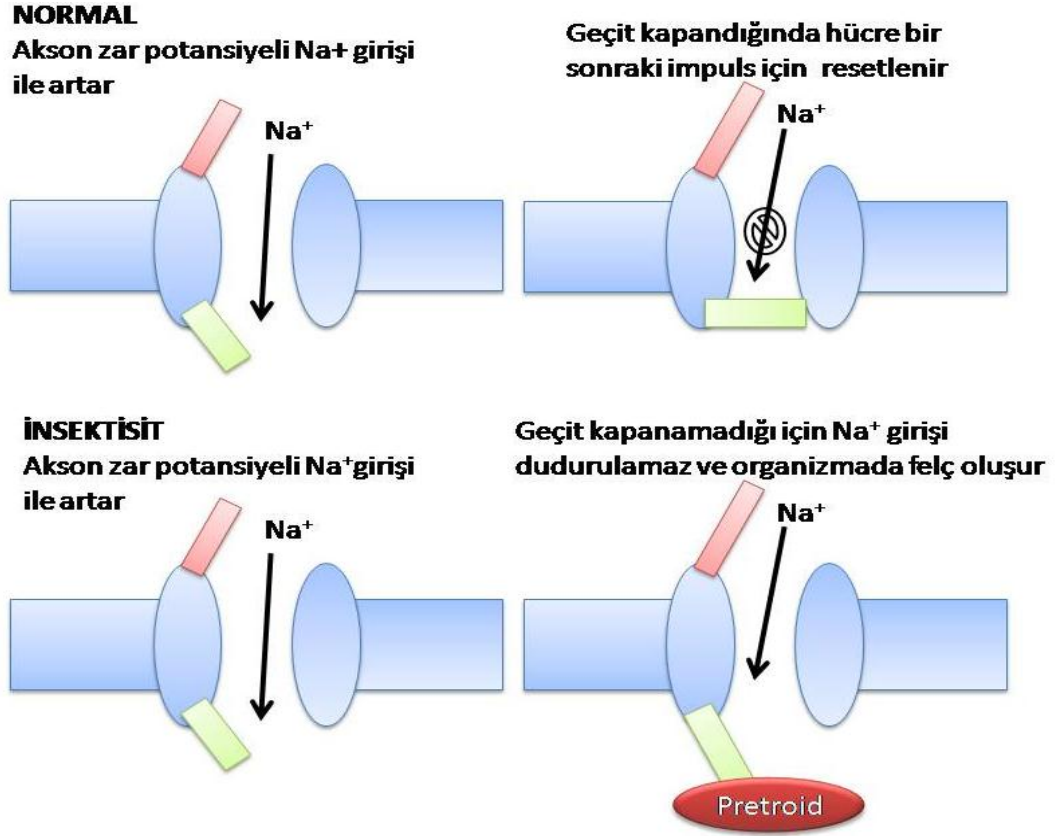
D-Phenothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin ve Deltamethrin ile yapılan çeşitli araştırmalarda genotoksik bir etkiye rastlanmamıştır. Bifenthrin ve  $\lambda$ -Cypermethrin ile yapılan testlerde pozitif genotoksik etkiler saptanmıştır.

Pretraitlerin genotoksisitesine ait yapılmış çalışmalar ve sonuçları Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.2.** Pretraitlerin genotoksisitesine ait yapılmış çalışmalar ve sonuçları.

Pretrait türü	İn vivo	İn vitro	Deney tipi	Sonuç	Kaynak
D-Phenothrin					IPCS 1990
Cyfluthrin	Sıçan	Bakteri, maya ve memeli hücreleri	Programlanmamış DNA testi, Ames, MN	Negatif	IPCS 1996
$\alpha$ -Cyfluthrin					IPCS 1997a
Cypermethrin					IPCS 1997b
Deltamethrin					IPCS 2001
Bifenthrin	-	Fare lenfoma	MN	Pozitif/Negatif	IPCS 1993
	Sıçan	-	Doza bağlı Programlanmamış DNA testi	Pozitif	
$\lambda$ Cypermethrin	Balık, sıçan	-	MN, Kromozom aberasyon	Pozitif	Campana ve ark., 1999; Cavas ve ark., 2003; Celik ve ark., 2003

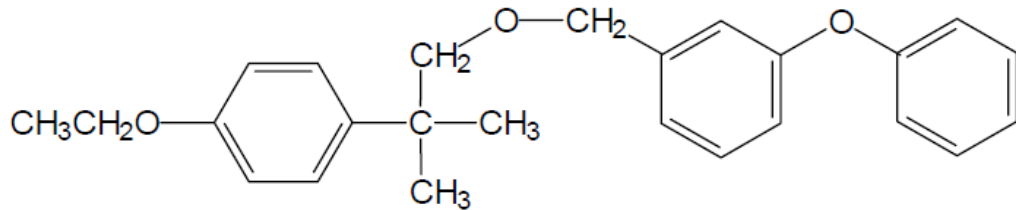




Şekil 2.3. Piretroidlerin etki mekanizması

### 2.5.4 Etofenprox

Etofenprox piretroid kaynaklı yağda çözünür bir insektisittir (Şekil 2.4) (Becker ve ark. 2010). Dolayısıyla böcek sinir sistemine ait iyon kanallarına etki eder. Doğrudan temas veya vücuda alınımı halinde böceğin sinir sistemini bozarak paralizise yani felce neden olur.



Şekil 2.4. Etofenprox'un kimyasal yapı formülü ([http://www.who.int/whopes/quality/en/Etofenprox\\_eval\\_WHO\\_july\\_2007.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/en/Etofenprox_eval_WHO_july_2007.pdf), 2013).

Benzen yapılı olan etofenprox, Thysanoptera, Hymenoptera Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera ve Diptera sınıflarına ait türlere karşı tarım, bahçecilik, bağcılık, orman, hayvan sağlığı ve halk sağlığı alanlarında kullanılmaktadır (Çizelge 2.3).

**Çizelge 2.3.** Etofenprox'un uluslararası tanımlama verileri ve kullanım alanları (Montgomery, 1995)

---

Kimyasal adı:	2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl ether (IUPAC). 1-[[2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropoxy]methyl]-3-phenoxybenzene (CA)
CAS No:	80844-07-1
Sinonimleri:	MTI-500; "Trebon"
Moleküler formülü:	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>
Moleküler ağırlığı:	376.49
Kullanım alanları:	Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Thysanoptera ve Hymenoptera Pirinç, çeşitli meyve ve sebzeler, mısır, soya fasulyesi ve çay.

---

Tarımda etofenprox, pirinç, meyve, sebze, mısır, soya fasulyesi ve çay gibi ürünlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Bitki kökleri tarafından zayıf bir emilime sahip olan pestisit bitki içindeki translokasyonu da düşüktür (De Lorenzo, 2010). Halk sağlığı sektör uygulamalarında, örneğin sivrisinek tüllerinde, vektör kontrol amaçlı faydalanılmaktadır ([http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report11/Etofenprox.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report11/Etofenprox.pdf), 2013).

Etofenprox'un toksikolojisine ait çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/Etofenprox07.pdf>, 2013). 1985 yılına ait etofenprox genotoksisite test sonuçları ise Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

#### *Akut toksisite*

Sıçan, LD <sub>50</sub> , oral	> 2000 mg/kg (vücut ağırlığı)
Sıçan, LD <sub>50</sub> , dermal	> 2000 mg/kg (vücut ağırlığı)
Sıçan, LC <sub>50</sub> , soluk alma	> 5.88 mg/L
Tavşan, deri tahrişi	Tahriş edici değil
Tavşan, göz tahrişi	Tahriş edici değil

#### *Kısa dönem toksisite*

Hedef/kritik etki	Karaciğer/ vücut ağırlık kaybı
Oral en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL)	20 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük
Dermal en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL)	1000 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük
Solukta en düşük etkisizlik konsantrasyonu (NOAEC)	0.21 mg/L

#### *Üreme toksisite*

Hedef/kritik etki	Böbrek/böbrek büyümesi
Üreme en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL)	246 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük
Gelişim en düşük etkisizlik seviyesi (NOAEL)	100 mg/kg (vücut ağırlığı) günlük

#### *Nörotoksisite*

Akut nörotoksisite	Negatif
Subakut nörotoksisite	Negatif

#### *Ekotoksisite*

Kuşlar (mallard ördekleri) LD <sub>50</sub> , akut oral	>2000 mg/kg
Balıklar (sazan) LC <sub>50</sub> (48 sat)	>5.0 ppm

Planktonik (Daphnia) LC <sub>50</sub> (3 saat)	>40 mg/l
Toprak solucanı LC <sub>50</sub> (7 gün)	43.1 ppm
LC <sub>50</sub> (14 gün)	24.6 ppm

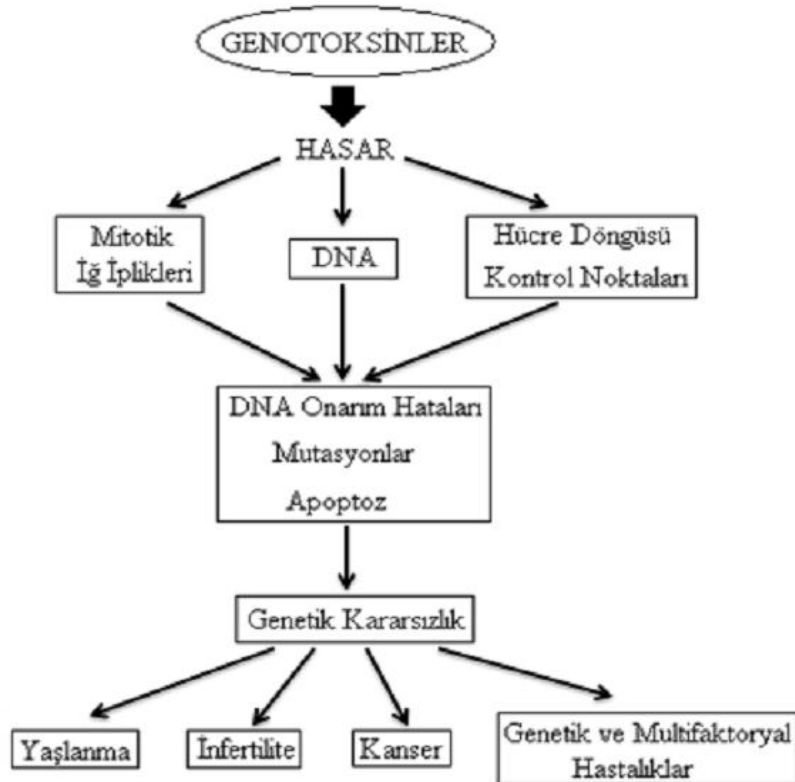
**Çizelge 2.4.** Etofenprox ile yapılan genotoksisite test sonuçları

Test sistemi	Test objesi	Etofenprox Konsantrasyonu	Saflık	Sonuçlar	Referanslar
<b><i>In vitro</i></b>					
Ames testi	S. typhimurium TA100, TA98, TA1535, TA1537, TA1538	200-3200 µg/petri; Solvent DMSO	96,3	Negatif	Foster, 1985
HGPRT (gen mutasyonları)	Chinese hamster V79 hücreleri	9,75-156 µg/ml; Solvent DMSO	96,3	Negatif	Seeberg, 1985
Kromozom aberasyon testi	İnsan lenfositleri	12,5-50 µg/ml; Solvent DMSO	97,3	Negatif	Bootman ve ark., 1985
Planlanmamış DNA sentezi	İnsan HeLa S3 hücreleri	9,75-156 µg/ml ve 2.44-39 µg/ml Solvent DMSO	96,3	Negatif	Seeberg, 1985
<b><i>In vivo</i></b>					
Kemik iliği mikronükleus testi	CD-1 fare	80, 400 ve 2000 mg/kg. 24, 48 ve 72 saatte tek doz	96,3	Negatif	Bootman ve ark., 1985

## 2.6 Toksisitenin Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazı Test Yöntemleri

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

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler (Kirsch-Volders ve ark., 2003). DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Şekil 2.5) (Mateuca ve ark., 2006).



Şekil 2.5 Genotoksinlerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Şekerlioğlu ve Şekerlioğlu, 2011).

Genetik sistemler ile genotoksitesini test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart in-vitro ve in-vivo mutajenite testleri; Klonojenik test, Ames testi, Komet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (Şekerlioğlu ve Şekerlioğlu, 2011) .

Bu bölümde çalışmada kullanılan Klonojenik, Mikronükleus ve Komet testleri tanıtılacaktır.

### **2.6.1 Klonojenik Test**

Klonojenik veya koloni oluşum testi in-vitro koşullarda tek bir hücrenin bir koloni oluşturma potansiyeline dayalı, hücre hayatta kalım ölçüsüdür. Böyle bir ölçümde koloni tek bir hücrenin bölünmesiyle oluşmuş en az 50 hücrelik bir kitledir. Klonojenik test popülasyondaki her bir hücrenin bölünebilme yeteneğini test etmek için kullanılır (Franken ve Rodermond, 2006). İyonize radyasyon veya çeşitli sitotoksik ajanların etkilerini belirlemek amacıyla bu ajanlara ait çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası oluşan hücresel yıkımın tölare derecesinin tespiti temel hedefdir (Muller ve ark., 2011)

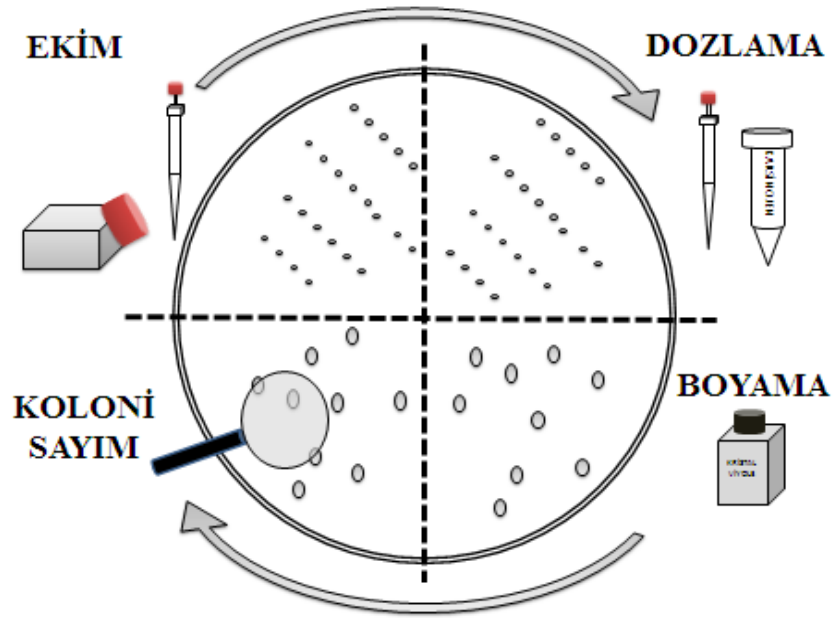
Klonojenik test, bir hücrenin geniş bir koloni ya da klon oluşturacak şekilde üreme kabiliyetini korumasına ve süresiz olarak proliferasyon olabilmeye dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücreler denilmektedir (Fabre ve ark., 2011). Ekilen hücrelerden sadece bir fraksiyonu koloni oluşturabilme yeteneğini koruyabilecektir. Hücrelerin uygun miktarlardaki ekimleri sonrası istenilen ajan ile dozlama yapılarak inkübasyon gerçekleştirilir. Petride oluşan koloniler fikse edilerek kristal viyole ile boyanır. Boyanan koloniler sterio mikroskop veya çıplak gözle sayılır (Şekil 2.6). Hayatta kalım eğrisi çizilerek incelenen veriler yorumlanır.

Klonojenik hücrelerden hayatta kalmış DNA ve protein sentezi gibi canlılık faaliyetlerini koruyabilen hatta bölünebilen hücrelerden bazıları belirlenen sürede yeterli proliferasyon gerçekleştiremediğinden koloni oluşturamazlar ve ölü olarak nitelendirilirler. Bu nedenle koloni sayımı yapılırken en az 50 hücre içeren koloniler

sayılmaktadır (Prasad ve ark., 2011). Potansiyel olarak uygun koşullarda belirli sayıda ekilen her bir hücreden bir koloni oluşması idealdir. Fakat büyüme ortamının optimal olarak hazırlanamaması ve hatalı hücre sayımı gibi bazı nedenlerden dolayı çoğu zaman bu ideal sayıya ulaşamaz.

Klonojenik teste ait olan terimlerden *Kaplama Etkinliği* (Plating Efficiency), ekilen hücrelerden koloni oluşturabilenlerinin yüzdelik ifadesidir. Belirli sitotoksik ajan konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerin hayatta kalma ve koloni oluşturma sayıları ile konsantrasyonlar arasındaki matematiksel ilişkiye *Hücre Sağkalım Fraksiyonu* (Cell Survival Fraction) denir (Coşkun, 2013).

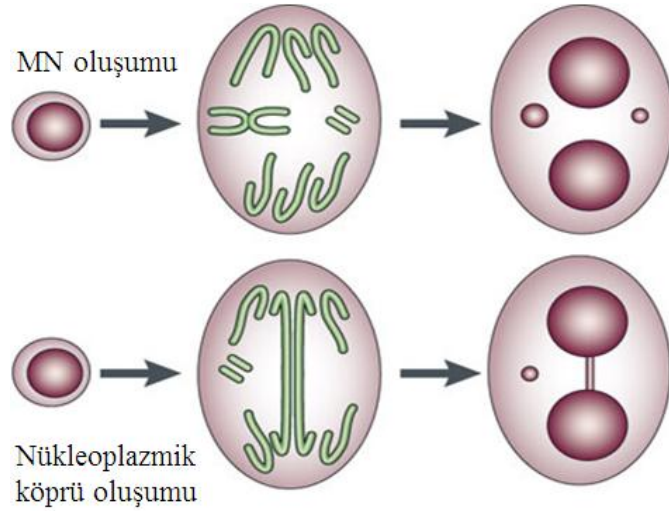
Radyasyonun hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen klonojenik test protokolü, günümüzde çeşitli ajanların sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla da sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin çeşitli kemoterapi ajanları ve bunların radyasyon ile kombine uygulamaları kanser biyolojisinin çalışma alanlarındandır (Munshi ve ark. 2005).



**Şekil 2.6** Klonojenik testin genel basamakları

## 2.6.2 Mikronükleus Testi

MN'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, iğ ipliğindeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (Şekil 2.7). MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Vanparys ve ark. 1990, Duffaud ve ark., 1997; Kirsch-Volders ve ark., 1997; Stopper ve Müler 1997; Choy 2001; Demirel ve Zamani 2002).



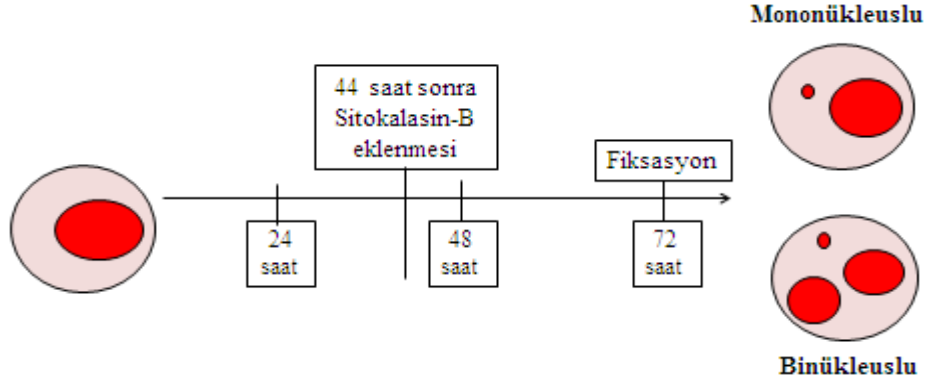
**Şekil 2.7** Mikronükleus ve nükleoplazmik köprü oluşumları (Fenech, 2007).

MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde in-vitro ve in-vivo olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Stopper ve Müler 1997).

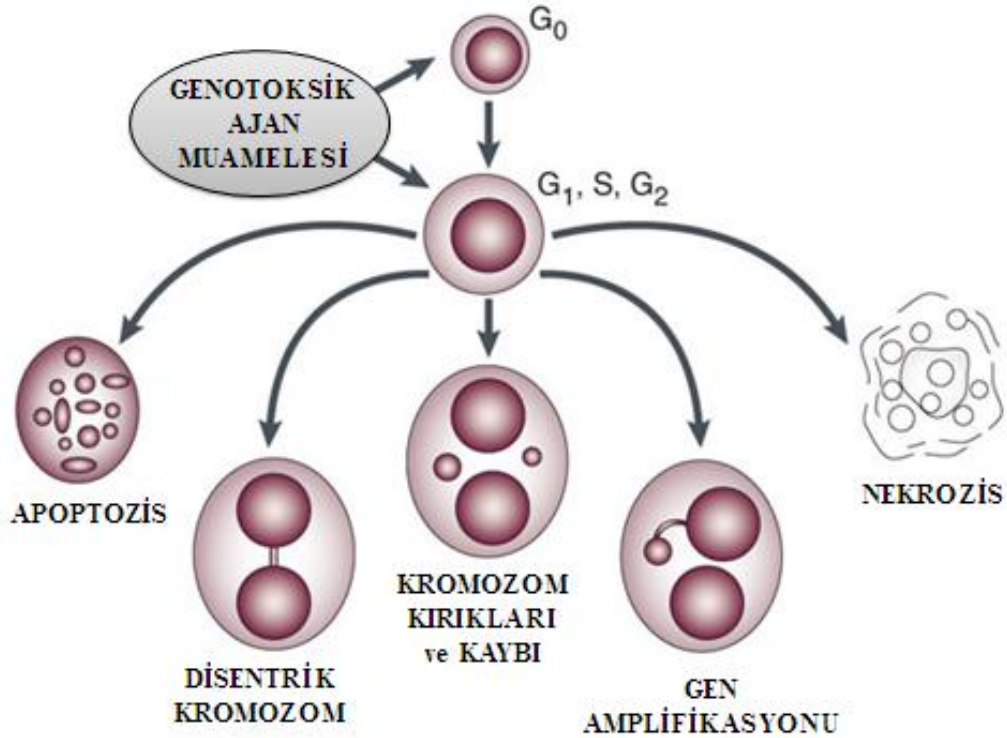
İn-vitro MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalsin-B maddesi ilave edilmektedir. Bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan binükleat (çift



nükleuslu) hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.8). İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilmekte ve preparatlarda MN bulunduran binükleat hücrelerin oranı tespit edilmektedir (Şekil 2.9) (Choy, 2001; Krishna ve Hayashi 2000).

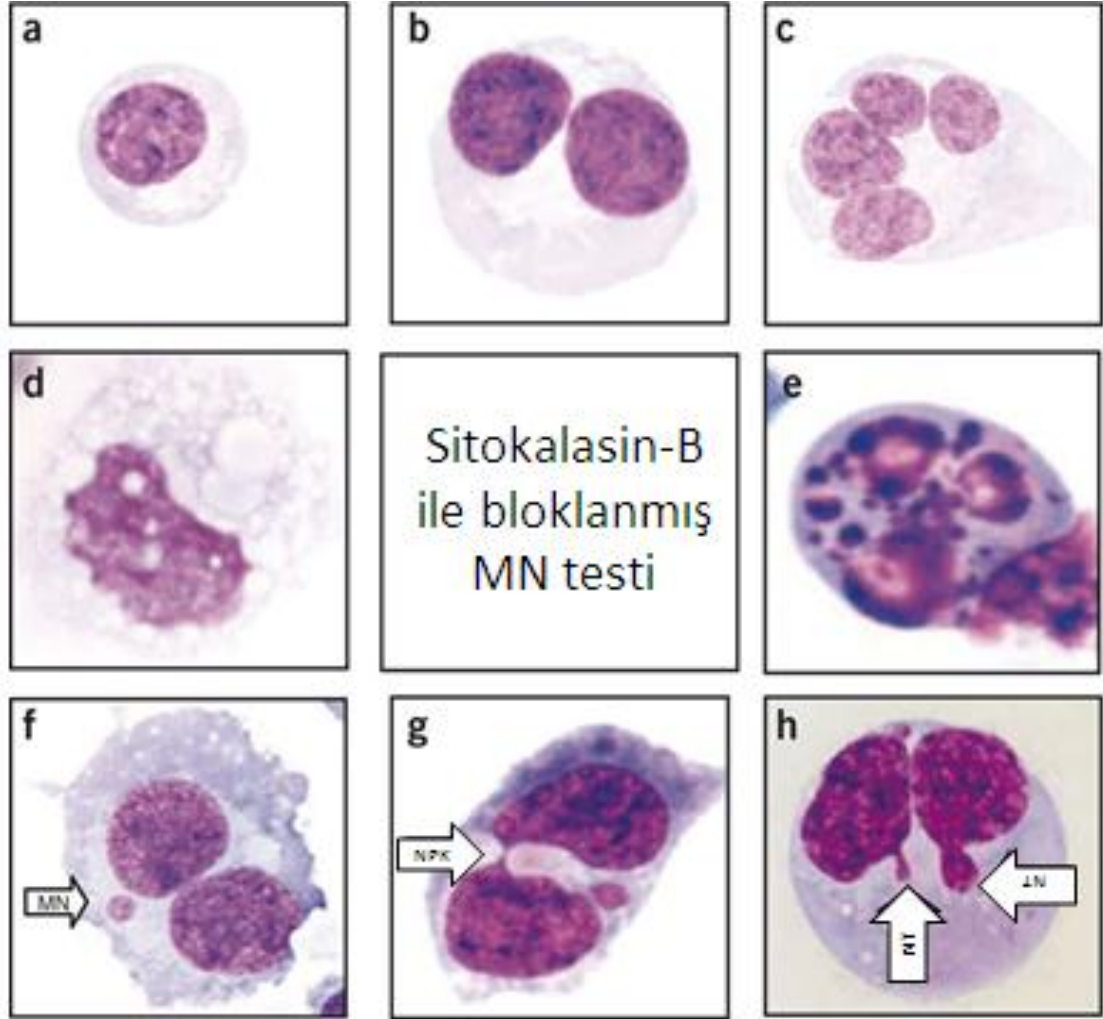


Şekil 2.8 Sitokalsin-B ilavesi ve MN oluşumları.



Şekil 2.9 Genotoksik ajan muamelesi akabinde, sitokinezi bloklanmış hücre kültürlerinde ortaya çıkabilecek çeşitli sonuçlar (Fenech, 2007).

İn-vivo MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenmektedir (Şekil 2.10). Bu test ile genellikle kemik iliğinde ve/veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır (Heddle, 1973; Krishna ve Hayashi 2000; Schmid, 1975; Hayashi ve ark., 2000).



**Şekil 2.10** Sitokalsin-B ile bloklanmış MN testi ile sayılmış hücelere ait mikrograflar. (a) Mononükleuslu hücre, (b) Binükleuslu hücre, (c) Multinükleuslu hücre, (d) Genç nekrotik hücre, (e) Geç apoptotik hücre, (f) Birden çok MN taşıyan binükleuslu hücre, (g) Binükleuslu MN ve nükleoplazmik köprü (NPK) taşıyan hücre, (h) Binükleuslu nüklear tomurcuklar (NT) taşıyan hücre. ([http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n5/fig\\_tab/nprot.2007.77\\_F3.html](http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n5/fig_tab/nprot.2007.77_F3.html), 2013)

Fenech (2007) *Nature Protocols* dergisinde yayımladığı makalede, binükleat hücrelerde ve MN sayımında aşağıdaki kriterleri belirtmiştir.

Sitokinezi bloklanmış hücrelerde, binükleat hücrelerde ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır:

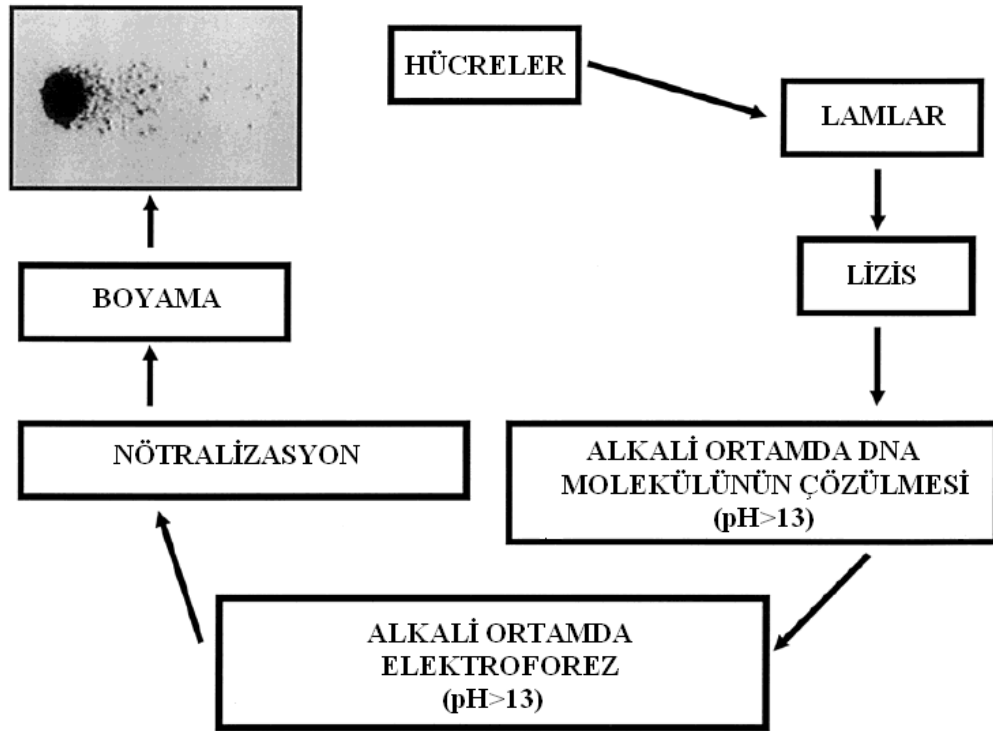
- 1) Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır (Şekil 2.10).
- 2) Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.
- 3) MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
- 4) MN'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.
- 5) MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronüklear sınırlar nüklear sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır (Şekil 2.10).
- 6) Boya alma yoğunluğu ana nükleus ile aynı olmalıdır.
- 7) Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmalıdır.

Sitokinasin-B varlığında mononükleuslu hücreler 24 saat içinde, binükleuslu hücreler ise 72 saatlik bir periyot sonrası hasat edilmelidir. Ayrıca apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde 24 saatlik bir inkübasyon yeterli olacaktır (Titenko-Holland ve ark. 1997, Fenech 2000).

### **2.6.3. Tek Hücre Jel Elektroforez “KOMET” Testi**

Genlerde DNA molekülleri ile toksik ajanların (genotoksin) etkileşmesi sonucu oluşan genotoksisiteyi belirlemede kullanılan diğer bir yöntem Komet tekniğidir. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Komet tekniği, memeli hücrelerindeki DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit ve duyarlı bir tekniktir. Komet tekniği, genetik toksikolojide birçok alanda kullanılmaktadır (McKelvey-Martin ve ark., 1993). DNA kırıklarının belirlenmesi ilk olarak 1978 yılında hücrelerin lam üzerinde agar gömülmesi ve DNA açılımını sağlamak için hafif alkali şartlarda liziz edilmesi ile olmuştur. Daha sonra 1984'te Ostling ve Johnson agarozda gömülen hücreleri lam üzerine yayarak yüksek tuz ve deterjanla liziz etmişler ve ardından elektroforeze tabi tutmuşlardır. Akridin oranj gibi

DNA bağlayıcı floresan boyasıyla boyamışlardır. Elektroferez işlemi sonunda hasarlı DNA çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız (komet) görüntüsünün oluşmasına neden olmuştur. Bu nedenle hasarlı hücrelere “komet” adı verilmiştir (Ostling ve Johnson, 1984; Kassie ve ark., 2000). Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen bu yöntem nötral pH'daki lizis şartları uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin edilebilmekteydi (Şekil 2.11) (Kassie ve ark., 2000). Bu nedenle bu teknik daha sonra 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali koşullarda yapılarak değiştirilmiş ve sadece DNA tek sarmal kırıklarının belirlenmesini sağlayan teknik geliştirilmiştir. Bu teknik ayrıca DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış ekzisyon tamir bölgelerinin tespitinde de kullanılmaktadır (Singh ve ark., 1988).



**Şekil 2.11** KOMET testi aşamaları (Tice ve ark. 2000).

Toksik ajanların meydana getirdiği DNA tek sarmal kırıklarının belirlenmesi için çift sarmalın açılması gerekmektedir. Bunun için de denatürasyon, çift sarmalın çözülmesi, ve tek sarmal kırıklarının yanında sadece alkali ortamda açığa çıkan kırıkların (alkali

labile sites) tespiti için yüksek pH'dan yararlanılmaktadır (Fairbairn ve ark., 1995). Nötral şartlarda kuyruk kısmında sadece gevşek iplikçikler varken DNA parçacıklarının alkali ortamda gözleendiği belirtilmiştir (Lima ve ark., 1991; Klaude ve ark., 1996; Collins ve ark., 1997; Marrs ve Dewhurst, 2000). Singh ve arkadaşlarının modifiye ettikleri komet tekniğinde de hücreler agara gömülür ve DNA'nın denatüre olması ve hücrelerin lize edilmesi için en az bir saat kadar alkali çözeltide bekletilir. Daha sonradan DNA'nın negatif yüklü olan kırık uçları pozitif yüke doğru elektroforez işlemi boyunca göç ederler. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü gözlenir. DNA'da oluşan düşük hasarlar seviyesinde göçten çok yayılma gözlenirken, hasar artması ile DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı hücrelerde (apoptotik) baş ve kuyruk tamamen ayrı gözlenir (Fairbairn ve ark. 1995). Komet tekniğinde hasarlı hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti baş tarafta yoğundur ancak DNA'da kırıklar meydana geldiğinde floresan şiddeti çekirdekten kuyruğa doğru şiddetlenir. Bu test sisteminde hasarlı hücrelerde baş kısmından kuyruğa geçiş olduğundan dolayı, DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu önemli parametrelerdir (McKelvey-Martin ve ark., 1993).

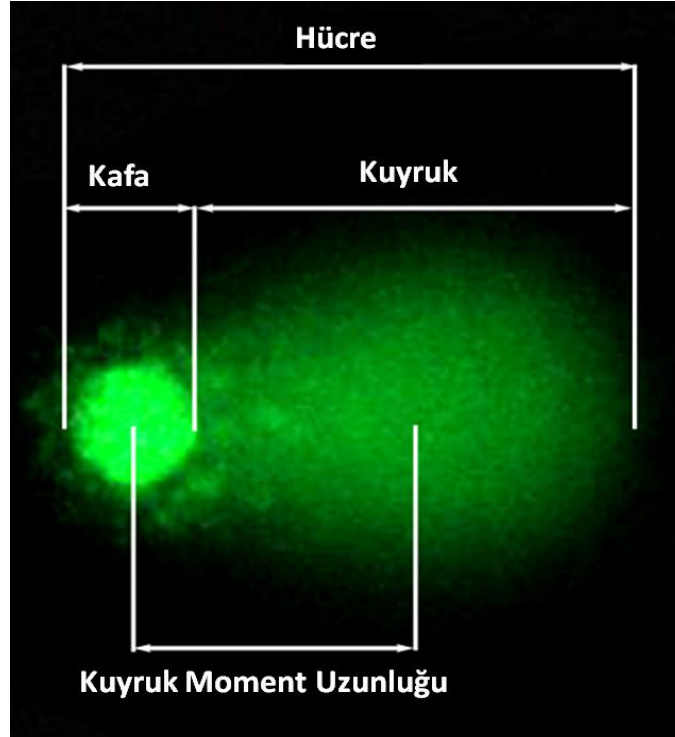
DNA hasarlı olan apoptotik hücrelerde baş ve kuyruk tamamen dağılmıştır. Komet tekniği sonuçlarının değerlendirilmesinde gelişmiş laboratuvarlarda görüntü analiz programları uygulanmaktadır. Ayrıca komet; göz ile hasarlı, orta dereceli hasarlı, az hasarlı ve hasarsız olarak değerlendirilebilmektedir (Liu ve ark., 2011). Görüntü analizi yapılan laboratuvarlarda kuyruk momenti (kuyruk uzunluğunun kuyruk içindeki toplam DNA miktarına oranı), kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu dikkate alınarak sonuçlar değerlendirilmektedir (Şekil 2.12 ) (Yılmaz, 2008).

Komet tekniğinin hassasiyetini elektroforez şartları (voltaj, süre), lising solüsyonu şartları (pH, tuz konsantrasyonu, süre) etkileyebilmektedir. Bunun için deneyde şartlar sabit tutulmalıdır (Yılmaz ve ark., 2008).

Komet tekniği diğer sitogenetik analiz yöntemlerine göre bir takım avantajlara sahiptir:

1. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir (Çizelge 2.5)
2. Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.

3. Hızlı sonuç elde edilebilen bir tekniktir.
4. Her türlü ökaryotik hücreye uygulanabilmektedir.
5. Hücrelerdeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenmesini sağlamaktadır (Olive ve ark., 1990; Fairbairn ve ark., 1995; Ünal, 1998; Kassie ve ark., 2000; Tice ve ark., 2000).



**Şekil 2.12** Komet hücre parametreleri

KOMET testinin genetik toksikoloji de kullanım alanları şunlardır:

1. Potansiyel yüksek oranda sonuç içeren tarama çalışmaları
2. Genotoksisite ile indüklenen kromozom hasarını, sitotoksisite ile indüklenen kromozom hasarından ayırt etmek
3. İn vivo çalışmalarda genotoksik ve genotoksik olmayan karsinojenleri ayırt etmek
4. İnsan mutajenlerini ve karsinojenlerini tayin etmek

**Çizelge 2.5.** Komet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri (Ünal, 1998)

İnsan Dokuları	Hayvan Dokuları	
- Adenokarsinoma	- Akciğer	- Splenositler
- Epitelyum (Lens, mukoza)	- Beyin	- Testis
- Fibroblast (Deri)	- İdrar kesesi	- Timositler
- Kan (Lenfositler, Granülositler, T Hücreleri)	- Embriyo	- Pankreas
- Lenfoma	- Böbrek	- Mukoza epiteli
- Spermatozitler	- Karaciğer	- Mide
	- Kemik iliği	- Kolon
	- Lenfositler	

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmalarımız Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan hücre kültürü ve genetik toksikoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Deney çalışmalarımızda kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, sarf malzemelerin adları, markaları ve katalog numaraları ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmalarda kullanılan ekipman

<b>Ekipman</b>	<b>Marka / Model</b>
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Komet Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi	KAMERAM
Elektroforez	Biometra Analitik
Elektroforez Güç Kaynağı	Power Pack P 25
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA – HI 221
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CHL
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO <sub>2</sub> takviyeli)	BINDER – CB 150
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO



Inverted mikroskop	SOIF
+4°C Standard Buzdolabı	BEKO
Hücre sayım cihazı	ROCHE
Lamel (24x60mm)	Marienfeld
Lam (26x76mm)	Marienfeld

---

**Çizelge 3.2.** Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

<b>Sarf Malzeme</b>	<b>Firma / Katalog No</b>
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml'lik)	COSTAR STRIPETTE
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT MIDI PLUS
Steril 15 ml lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Steril petriyerler (60 ve 100 mm'lik)	FALCON
Etil alkol	AY-KİM
Etofenprox	SHENZEN CO. LTD
Metanol	MERCK 1060082500
Asetik asit	MERCK 1000632511
Potasyum	MERCK 1049361000
Sitokalsin-B	SIGMA C6762
Giemsa	MERCK 1092040500
Kristal viyole	MERCK 1159400100
Paraformaldehit	SIGMA – ALDRICH P6148
Triton X-100	GERBU 2000
Bovine Serum Albumin	SIGMA- ALDRICH A9418
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA 12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA 08537

Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA	SIGMA – ALDRICH T4049
DPBS/Modified	THERMO SH30028.02

---

### 3.2. Etofenprox Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmalarımızda kullandığımız alkolde çözülebilir etofenprox (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>) SHENZEN CO. LTD firmasından kristal formunda temin edilmiştir. Stokun 50 µl'sinde (maksimum doz için çekilecek miktar) 8000 µg Etofenprox olması amacıyla 80 mg kristal etofenprox 5 ml absolute etanol içerisinde çözüldükten sonra oda sıcaklığında saklanmış ve deneylerden önce istenilen konsantrasyonları elde etmek üzere RPMI besiyeri ile seyreltilmiştir (Vasquez 2011).

### 3.3. Kullanılan Hücre Hattı (CHO) ve Kültür İşlemleri

Çin Hamsteri Ovaryum (Chinese Hamster Ovary-CHO) hücre kültürü T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü Ankara'dan temin edilmiştir. CHO hücreleri filtre kapaklı T-75 flasklarda, RPMI-1640 besiyerinde, % 5 CO<sub>2</sub> takviyeli 37°C'lik etüvlerde kültüre alınmışlardır. Hücreler rutin olarak 2 günde bir beslenmiş ve % 85 doluluğa ulaştıklarında pasajlanmışlardır.

CHO hücrelerinin pasajlanma prosedürü:

<i>Gerekli Sarf Malzemeler</i>	<i>Gerekli Kimyasallar</i>
15 ml steril tüpler	Steril PBS Çözeltisi
Steril serolojik ve pastör pipetleri	Tripsin-EDTA (% 0,25'lik)
T-75 Flasklar	RPMI-1640 Besiyeri

- 1) Pasaj doluluğuna ulaşan T-75 flasksındaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
- 2) Hücreler 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılmıştır.
- 3) Flasklara daha sonra 3 ml tripsin eklenerek 1 – 2 dakika beklenmiştir.
- 4) İvert mikroskop altında hücrelerin zeminden ayrıldığı kontrol edilmiş ve tripsin reaksiyonunu durdurmak için flasklara aynı miktarda besiyeri eklenmiştir.
- 5) Flasktaki hücre süspansiyonu steril serolojik pipet ile toplanarak önceden etiketlenmiş olan 15 ml'lik falcon tüplerine aktarılmıştır.
- 6) Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 7) Daha sonra süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 100 µl kalacak şekilde aspire edildikten sonra kalan pellet 5 ml besiyeri içinde yeniden süspanse edilmiştir.
- 8) Hücre sayım cihazı ile süspansiyondaki toplam hücre sayısı belirlendikten sonra yeni flasklara ekilecek hücre miktarını elde etmek için gerekli olan süspansiyon miktarı belirlenmiş ve taze besiyeri içeren flasklara aktarılmıştır.
- 9) Yeni ekim yapılan flasklardaki hücreler 37 °C'lik etüvde inkübe edilmişlerdir.

### **3.4 Deney Grupları**

Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücreleri ile yapılan klonojenik, mikronükleus ve komet testlerimize ait dozlama grupları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

#### **3.4.1 Kontrol Grupları**

Deneylelerimizde negatif, pozitif ve solvent olmak üzere üç tip kontrol grubu kullanılmıştır.

*Negatif Kontrol (NK):* Herhangi bir ajana maruz kalmayan kontrol grubu.

*Solvent Kontrol (SK):* Solvent (etanol) kontrol grubumuzda final konsantrasyonu % 0,05'i geçmeyecek şekilde absolut etanol kullanılmıştır.

*Pozitif Kontrol (PK):* Genotoksisite karşılaştırmalarında ve test sistemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla 0,05 M'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

### Çizelge 3.3. Doz deney grupları

---

Kontrol

Solvent Kontrol 50 µl etanol

Pozitif Kontrol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10µg/ml stok çözelti) 200µl aktarıldı

1 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	100 µg'lık stoktan	<b>0.0625 µl</b>	aktarıldı
5 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	100 µg'lık stoktan	<b>0.315 µl</b>	//
10 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	100 µg'lık stoktan	<b>0.625 µl</b>	//
50 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	500 µg'lık stoktan	<b>3.125 µl</b>	//
100 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	1000 µg'lık stoktan	<b>6.25 µl</b>	//
200 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	2000 µg'lık stoktan	<b>12.5 µl</b>	//
400 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	4000 µg'lık stoktan	<b>25 µl</b>	//
800 µg/ml ->	10 ml besiyeri için	8000 µg'lık stoktan	<b>50 µl</b>	//

---

#### 3.4.2 Klonojenik Test Grupları

Etofenprox'un sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla CHO hücreleri 24 saat süresince 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800 ve 1600 µg/ml konsantrasyonlarında etofenprox'a maruz bırakılmışlardır. Klonojenik test sonuçlarına göre **IC<sub>50</sub>** değeri hesaplanarak düşük ve yüksek sitotoksik etkiye sahip değerler seçilerek genotoksisite testleri gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4.3 Genotoksisite Test Grupları

Genotoksisite test grupları, klonojenik test sonuçlarına göre etofenprox dozları Mikronükleus testi için 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400 ve 800 µg/ml ve Komet testi için ise 1, 5, 50, 200, 400 ve 800 µg/ml olarak belirlenmiştir.

### 3.5 Klonojenik Test

Genotoksisite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların/dozların belirlenmesi amacıyla klonojenik test sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Munshi ve ark. 2005). Çeşitli konsantrasyonlardaki genotoksik ajan maruziyeti sonrası hücrelerin proliferasyon ve tutunma yetenekleri sınanarak ileride yapılacak diğer testler için % 75'den daha yüksek hayatta kalış oranı veren (düşük sitotoksik) konsantrasyonlar tercih edilir.

Çalışmamızda uygulanan klonojenik test basamakları şu şekildedir:

- 1) CHO hücreleri (~ 34 pasaj) prosedürde anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere alınmıştır.
- 2) Toplam hücre sayısı el sayım cihazı (Scepter™) ile belirlenmiştir.
- 3) Falcon tüpündeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 4) Süpernatant aspire edilerek pellet yeniden süspansiyon edilmiş ve T-25 flasklara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 5) İki gün sonunda %80 ve üzeri konfluent hale gelen hücreler dozlanarak 24 saatlik inkübasyona terk edilmişlerdir.
- 6) İnkübasyon sonrası hücreler tripsinlenerek etiketlenmiş olan tüplere toplanmışlardır.
- 7) Cedex XS Analizatör (ROCH) yardımıyla Trypan blue yöntemine dayalı canlı hücre sayımı yapıldıktan sonra 60 mm'lik dört adet petriye 500 canlı hücre ekilmiş (her konsantrasyon için) ve 10 gün süresince koloni oluşumları için inkübe edilmişlerdir.
- 8) Üç günde bir taze besiyeri ile beslenen petriyer invert mikroskopta düzenli aralıklarla incelenerek koloni gelişimi kontrol edilmiştir.
- 9) Yaklaşık on gün sonunda alınan petriyer PBS ile yıkayıp absolute etanol ile 10 dk fiske edilmişlerdir.
- 10) Fikse edilen hücreler kristal viyole ile 5 dk muamele edilerek boyanmışlardır.
- 11) En az 40 hücre içeren koloni büyüklükleri invert mikroskop yardımıyla belirlenmiş ve her bir petrideki koloniler sayılarak sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

*% yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) hesaplama formülü:*

$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksosite)} = \frac{\text{Petri başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

### **3.6 Sitokinez Bloke Mikronükleus Testi**

Sitokalsin-B ile sitokinez bloke yöntemine dayalı olarak gerçekleştirilen mikronükleus testi yapısal kromozom bozuklukları tespiti amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Fenech 2007). Çalışmada takip edilen prosedür basamakları şu şekildedir:

- 1) CHO hücreleri (~ 34 pasaj) prosedürde anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere alınmıştır.
- 2) Toplam hücre sayısı el sayım cihazı (Scepter™) ile belirlenmiştir.
- 3) Falcon tüpündeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 4) Süpernatant aspire edilerek pellet yeniden süspanse edilmiş ve T-25 flasklara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 5) İki gün sonunda %80 ve üzeri konfluent hale gelen hücreler dozlanarak 24 saatlik inkübasyona bırakılmışlardır.
- 6) Bir gün boyunca etofene maruz bırakılan hücreler tekrar beslenmiş ve her bir flaska Sitokalsin-B (5 µg/ml final konsantrasyon) eklenerek 1 gün boyunca inkübe edilmişlerdir.
- 7) İnkübasyon sonrası flasklar pasajlama prosedürüne göre tripsinlenerek hücreler etiketlenmiş falcon tüplerine alınmıştır.
- 8) +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilen tüplerde süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 200 µl kalacak şekilde aspire edilmiştir.
- 9) Oda sıcaklığında, taze hipotonik KCl (0,075 M) çözeltisinden 5 ml tüplere eklenmiş ve ~3 dk bekletilerek hücrelerin şişmesi sağlanmıştır.

- 10) +4 °C'de, 1000 rpm, 5 dk hipotonik çözelti içinde santrifüjleme sonrası, hücrelerden çözelti uzaklaştırılmış ve tüplere dikkatlice taze hazırlanmış karnoy fiksatif (3:1, metanol: glasiyel asetik asit) 5 ml oluncaya kadar eklenmiştir.
- 11) İki kez tekrarlanan fiksasyon sonrası hücreler alkolle silinmiş temiz lamalar üzerine yayılarak kurumaya bırakılmışlardır.
- 12) Kuruyan lamalar şalelerde % 5'lik giemsa boyası ile 15 dk boyanmıştır.
- 13) Boyama sonrası lamalar sudan geçirilmiş ve analiz zamanına kadar kurutulularak saklanmışlardır.

Çekirdek bölünme indeksi (ÇBİ) aşağıdaki formüle göre hesaplanır ve bulunan değer kimyasal veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede kullanılabilir (Kirsh-Volders ve ark. 2003).

Hazırlanan preparatlarda 1000 hücre sayılarak, mikronükleus taşıyan binükleuslu hücre frekansının yanı sıra tek (MI), iki (MII) üç (MIII) ve dört (MIV) nükleus taşıyan hücrelerin sayıları da kaydedilerek çekirdek bölünme indeksleri hesaplanmıştır.

Hesaplama kullanılan formül 1997 yılında Keshava ve arkadaşları tarafından aşağıdaki şekilde rapor edilmiştir.

$$N = MI + MII + MIII + MIV$$

$$ÇBİ = (MI + 2xMII + 3xMIII + 4xMIV) / N$$

ÇBİ:	Çekirdek bölünme indeksi	MII:	Üç nükleuslu hücre sayısı
MI:	Tek nükleuslu hücre sayısı	MIV:	Dört nükleuslu hücre sayısı
MII:	Çift nükleuslu hücre sayısı	N:	Toplam hücre sayısı

### 3.7 Alkali Komet Testi

Tek iplik DNA kırıklarını belirleyebilmek ve daha duyarlı bir genotoksisite ölçümü için alkali komet testi kullanılmıştır. Komet resimleri "KAMERAM" adlı bilgisayar aracılığı ile kayıt altına alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Alkali komet testinde kullanılacak olan kimyasallar deneyden önce aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

#### *Lizis Tamponu hazırlanışı*

2.5 M NaCl: 29.22 g NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA: 7.4448 g Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris: 0,2422 g Trisma Base hasas terazide tartılmıştır. Tartılan kimyasallar ısıtmadan 178 ml distile su da çözülmüş ve NaOH veya HCl kullanılarak pH=10' a ayarlanmıştır. Lizis işleminden yarım saat önce bu çözeltiye 2 ml Triton X-100 ve 20 ml DMSO eklenmiştir.

#### *Yürütme tamponu hazırlanışı*

0.747 Na<sub>2</sub>EDTA ve 24 g NaOH tartıldı ve 2 L distile su ile manyetik karıştırıcıda çözülmüş ve pH>13 olacak şekilde tampon hazırlanarak buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

#### *Nötralizasyon tamponu hazırlanışı*

Bu çözelti yürütme işlemi sonrası taze hazırlandı. 4.8456 g Trisma Base tartılır ve 100 ml distile suda çözüldü. pH=7,5 olacak şekilde HCl veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

#### *Boyama solüsyonu*

20g/ ml (dH<sub>2</sub>O) EtBr ile hazırlanmıştır.

#### *Lamlar için normal agaroz (NA) jel hazırlanışı*

0.65 g agaroz tartılmış ve 100ml distile suda ısıtılarak çözülmüştür.

#### *Hücreler için düşük kaynama noktalı agaroz(LMA) jel hazırlanışı*

0.065g düşük kaynama noktalı agaroz (LMA) tartılır ve ısıtılarak 10 ml distile suda çözülmüştür.



CHO hücrelerinde gerçekleştirilen alkali komet testine ait prosedür basamaklarını (Anderson ve ark., 1997, Olive, 2007) şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Bu test için öncelikle rodajlı lamalar deneyden 1 gün önce hazır hale getirildi. Bunun için 75g normal melting agaroz (% 0.65) 100ml dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş ve lamalar rodajlı kısmının yarısına kadar agarozla batırılmıştır. Altları silinerek oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- 2) Yaklaşık 34 pasaj sayısına sahip olan CHO hücreleri pasajlama prosedüründe anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmışlardır.
- 3) Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir.
- 4) Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilerek kalan pellet yeniden süspanse edilmiş ve dozlanacak T25 flaslara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- 5) Flaslara ekilen CHO hücreleri yaklaşık iki gün sonra %80 ve üzeri konfluent hale geldiği zaman dozlanmışlar ve 24 saat süresince inkübe edilmişlerdir.
- 6) Muamele kültürlerinden santrifüj ile (2000rpm'de1dk) CHO hücreleri çökelti olarak pelet üzerine 2ml PBS eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışımdan 100µl alınarak 37°C'lik su banyosu içerisinde 250µl LMA üzerine pipetajlanarak eklenmiştir.
- 7) Buz kalıbı üzerine kurutma kağıdı konularak lamalar dizilmiş ve her lamın ortasına ince şerit şeklinde 100µl LMA-CHO karışımı pipetlenerek üzeri uzun lamellerle kaplanmıştır.
- 8) Bu işlemden sonra +4°C'de 15dk bekletilmiş, daha sonra dolaptan çıkarılan preparatların üzerindeki lameller alınmıştır.
- 9) Alüminyum folyo ile sarılı lizis buffer bulduran şaleler içine lamalar yerleştirilerek +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.
- 10) Ertesi gün lamalar elektroforez tankına yerleştirilmiş ve DNA'nın açılabilmesi için güç kaynağı çalıştırılmadan yürütme tamponu içerisinde 15 dk bekletilmiştir.
- 11) 30 dakika boyunca 25 V-300A'lik akım altındaki yürütmenin ardından 5 dk karanlıkta nötralizasyon sıvısı içerisine terk edilen lamalar soğuk dH<sub>2</sub>O ile yıkayıp ve kurutulmuştur.
- 12) Etidyum bromid solüsyonu içerisinde 1 dk bekletilen lamalar floresans mikroskobu altında ölçüm ve incelenmeye alınmıştır.

- 13) Fotoğraflanarak seçilen her bir çekirdekdeki komet parametreleri “KAMERAM” yazılımı kullanılarak belirlenmiş ve ardından ortalama fokus/hücre sayısı hesaplanmıştır.
- 14) Her bir doz grubu için 50+50 olmak üzere 100 hücre analiz edilmiş ve deneyler en az iki kez olmak üzere tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

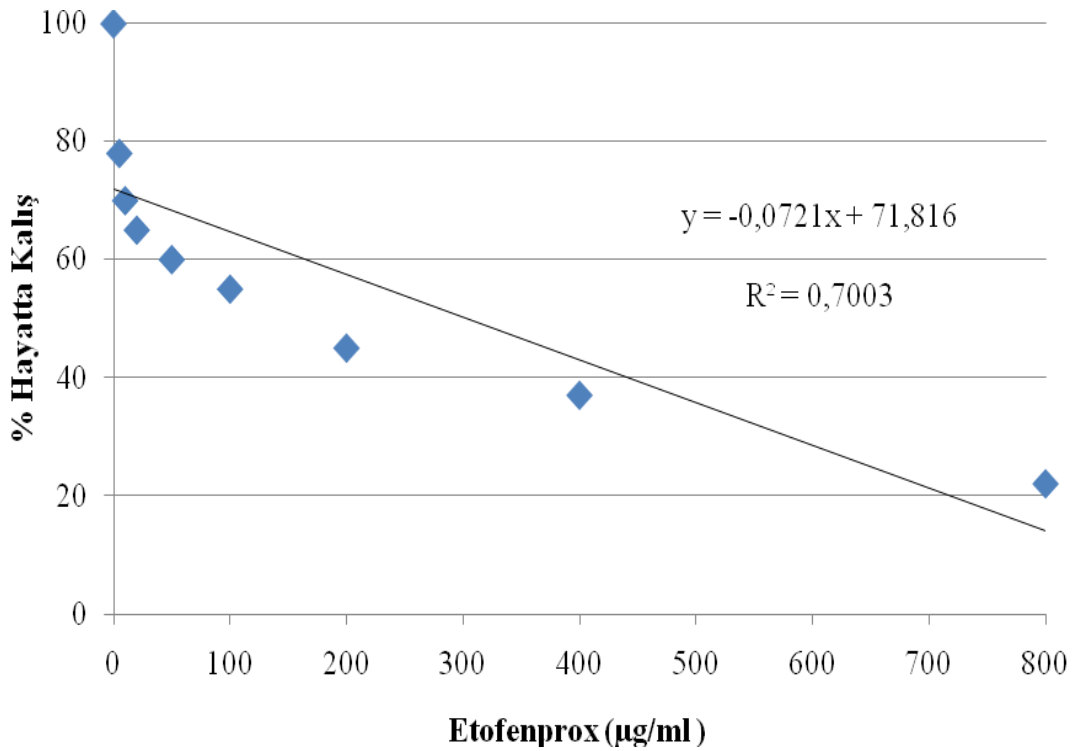
### **3.8 İstatistik Analizler**

Klonojenik sitotoksisite verilerinin analizinde Kruskal-Wallis testi, normal dağılım gösterdiği belirlenen Mikronükleus ve Alkali Komet testlerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması için ise parametrik testler kullanılmıştır. Varyans analizi ANOVA’yı takiben LSD (Least significant difference) testi kullanılarak karşılaştırılmışlardır. Doza bağımlı yanıtların karşılaştırılmasında ise regresyon analizi kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler SPSS 11 yazılımı kullanılarak bilgisayarda gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Etofenprox'un % Hayatta Kalış (Canlılık) Oranına Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılacak etofenprox konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla CHO hücreleri 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarındaki etofenprox'a maruz bırakılarak klonojenik test uygulanmıştır (Çizelge 3.3). Elde edilen sonuçlara göre test gruplarının % hayatta kalış oranları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde klonojenik test ile belirlenen % hayata kalış oranları

Formüle göre etofenprox'un CHO hücreleri üzerindeki  $IC_{50}$  değeri 302 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Genotoksisite testlerinde kullanılmak üzere  $IC_{50}$ 'nin (302 µg/ml) alt ve üst değerlerine sahip olan 1, 10, 50, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik etofenprox konsantrasyonları seçilmiştir.

#### 4.2 Etofenprox'un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkisi

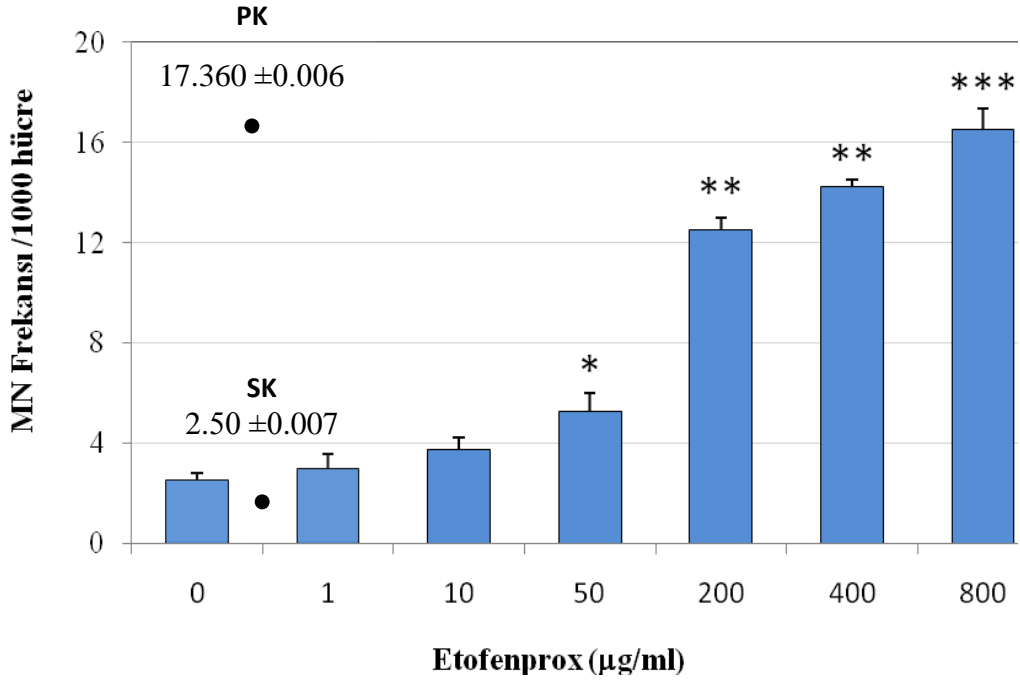
Tez çalışmamızda kullanılan etofenprox konsantrasyonlarının mikronükleus oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla CHO hücreleri 1, 10, 50, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik etofenprox'a 24 saat süresince maruz bırakılmış ve MN testi prosedürü uygulanmıştır. Her test grubu için oluşan % mikronükleus (MN) frekansı Çizelge 3.4 verilmiş ve Şekil 4.2'de grafik haline getirilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerindeki mikronükleus frekans tablosu.

Test maddesi	Dozlar (µg/ml)	MN farkansları		MN (%) ±SH
		MONO	Bİ	
Kontrol	---	10	1	2.52 ±0.002
SK (Etanol)	50 µl	2	0	2.50 ±0.007
PK (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	200 µl	119	13	17.360 ±0.006
Etofenprox	1 µg/ml	6	0	3.100 ±0.066
	10 µg/ml	6	0	3.850 ±0.056
	50 µg/ml	10	1	5.255 ±0.087
	200 µg/ml	53	4	12.495 ±0.085
	400 µg/ml	57	11	14.250 ±0.017
	800 µg/ml	62	17	16.495 ±0.094

Etofenprox'un mikronükleus frekansında kontrole oranla 1 ve 10 µg/ml dozları hariç ( $p>0.05$ ) tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı artışlara sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu artışlar istatistiksel anlamlılık olarak incelendiğinde 50 µg/ml için  $p<0.05$  düzeyinde, 200 ve 400 µg/ml için ise  $p<0.01$  düzeyinde önemli sonuçlara ulaşılmıştır. En yüksek farklılık ise 800 µg/ml'lik doz grubunda belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Regresyon analizlerinde MN frekanslarında görülen artışların doza bağımlı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0.05$ ).

En fazla bir mikronükleuslu binükleatlara rastlanmış olup dört ve daha fazla mikronükleus gözlenmemiştir (Çizelge 3.4).



**Şekil 4.2.** Çeşitli konsantrasyonlarda etofenproxa maruz bırakılan CHO hücrelerindeki mikronükleus frekansları (%) (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 4.3. Etoposideun Çekirdek Bölünme İndeksi (ÇBİ) Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda kullanılan etofenprox konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, MN testi sonucunda aşağıdaki formüle göre ÇBİ değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{ÇBİ} = (\text{MI} + 2 \times \text{MII} + 3 \times \text{MIII} + 4 \times \text{MIV}) / \text{N}$$

$$\text{N} = \text{MI} + \text{MII} + \text{MIII} + \text{MIV}$$

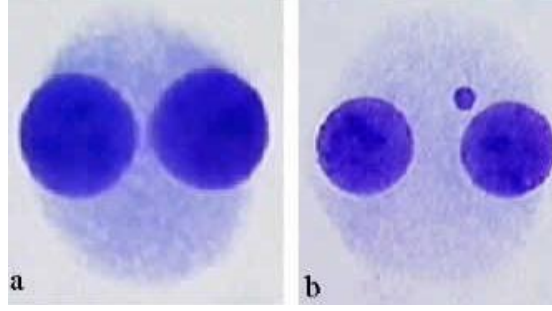
*MI: Mononükleuslu hücrelerin sayısı*

*MII: Binükleuslu hücrelerin sayısı*

*MIII: Trinükleuslu hücrelerin sayısı*

*MIV: Tetranükleuslu hücrelerin sayısı*

Hesaplama göz önüne alınan MN çekirdek yapısı Şekil 4.3.'de gösterilmiştir.



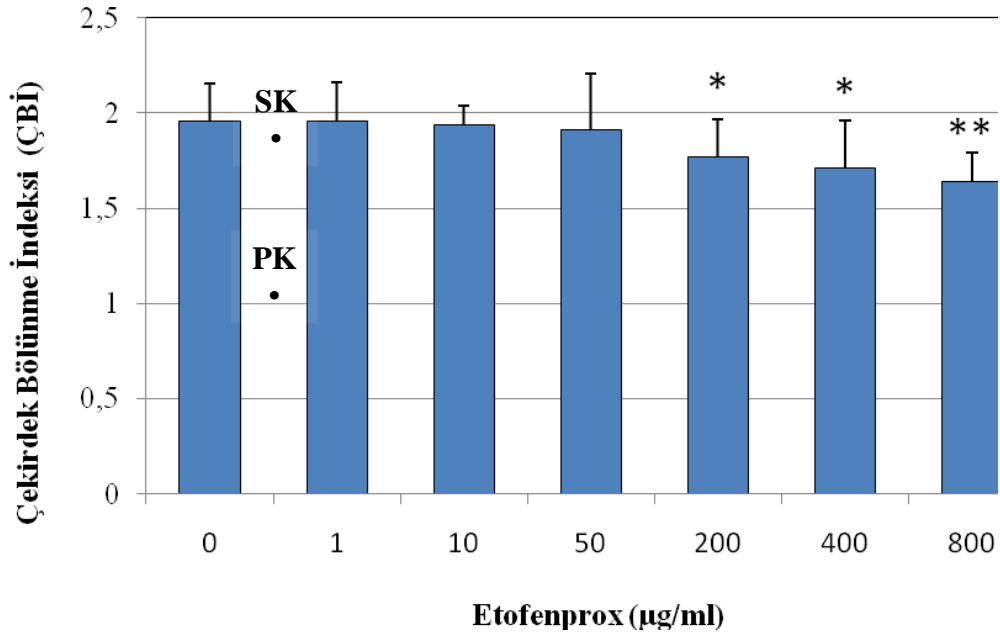
**Şekil 4.3.** Sitokalsin-B ile muamele edilmiş CHO hücrelerine ait görüntüler. a) Binükleat, b) MN'li Binükleat (Büyütme x1.000).

1, 10, 50, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik etofenprox ile 24 saat süresince muamele edilen test gruplarının ÇBİ değerleri Çizelge 3.5'te Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Çeşitli konsantrasyonlarda etofenproxa maruz bırakılan CHO hücrelerindeki ÇBİ değerleri

Test maddesi	Dozlar (µg/ml)	Skorlanan Çekirdek sayıları				ÇBİ ±SH
		1	2	3	4	
Kontrol	----	498	3254	180	68	1.954 ±0.101
SK (Etanol)	50 µl	1378	2253	247	122	1.931 ±0.097
PK (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	200 µl	1988	1953	51	8	1.213 ±0.226
Etofenprox	1 µg/ml	250	1634	104	39	1.960 ±0.121
	10 µg/ml	287	1612	102	31	1.941 ±0.095
	50 µg/ml	316	1553	106	20	1.910 ±0.187
	200 µg/ml	1222	2493	265	20	1.772 ±0.105
	400 µg/ml	1326	2496	164	14	1.712 ±0.167
	800 µg/ml	1708	2044	231	17	1.639 ±0.117

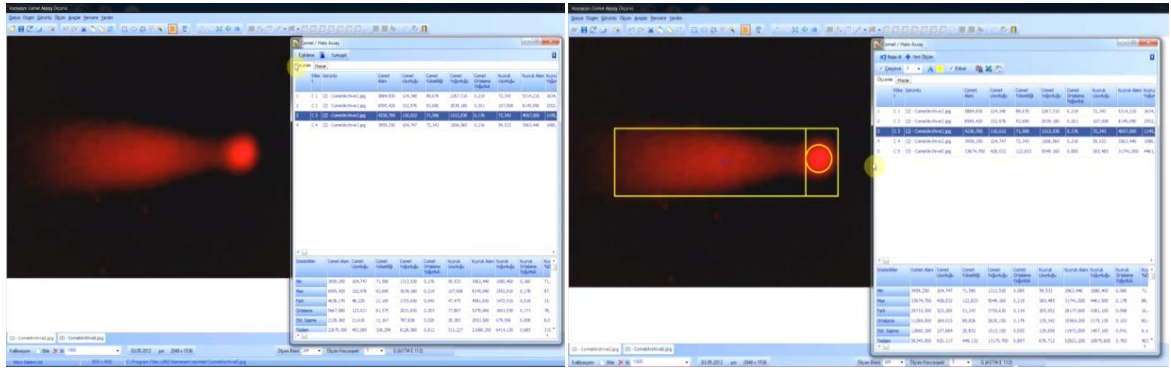
Etofenprox'un ÇBİ üzerine etkisi kontrole oranla 1, 10 ve 50 µg/ml dozlarında anlamlı bir düşüşe neden olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ). 200 ve 400 µg/ml dozlarında istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli ( $p<0.05$ ) bir düşüş gözlenirken 800 µg/ml'da bu farkın çok önemli ( $p<0.01$ ) olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.5.). Regresyon analizlerinde ÇBİ değerlerinde görülen azalışların doza bağımlı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0.05$ ).



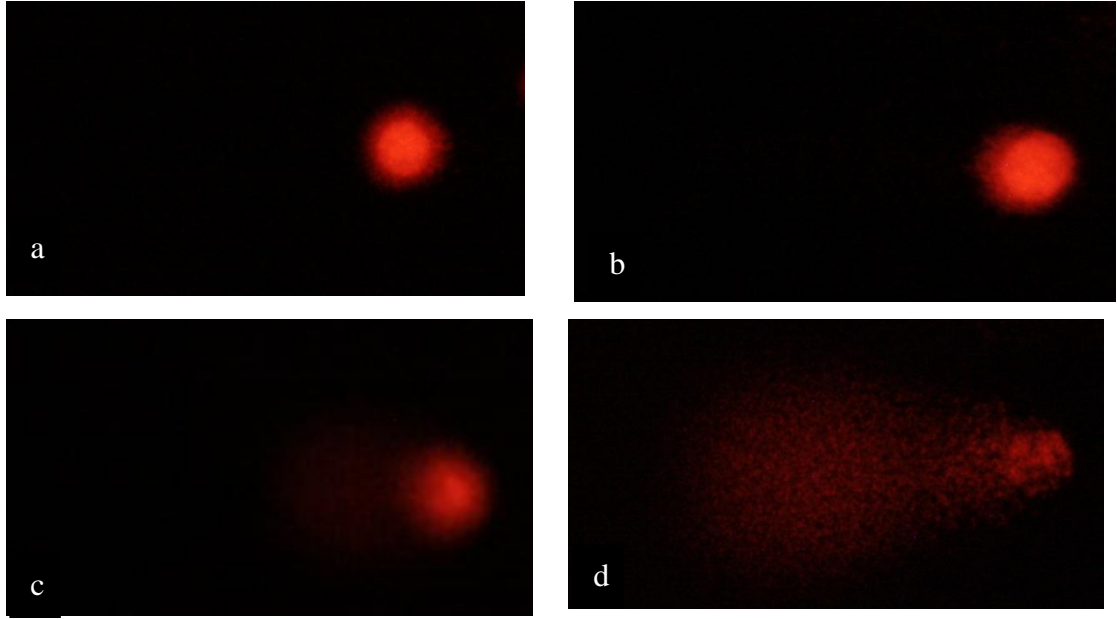
**Şekil 4.4.** Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde Çekirdek Bölünme İndeksi ÇBİ değerleri (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

#### 4.4 Etofenproxun Komet Oluşumu Üzerindeki Etkisi

Tez çalışmamızda kullanılan etofenprox konsantrasyonlarının komet oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla CHO hücreleri 1, 10, 50, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik etofenprox'a konsantrasyonlarına 24 saat süresince maruz bırakılmış ve alkali komet testi prosedürü uygulanmıştır. Komet ölçüm işlemleri "KAMERAM" adlı yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). CHO hücrelerindeki Komet oluşumları ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** KAMERAM programı ile komet değerlerinin belirlenmesi.



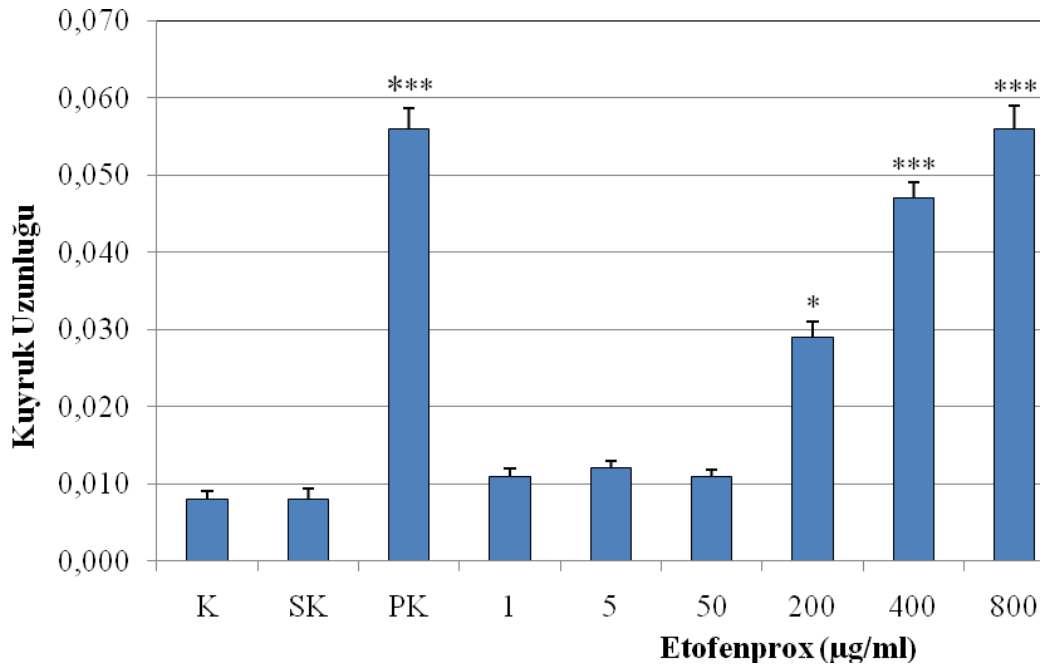
**Şekil 4.6.** CHO hücrelerinde komet oluşumları a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA (x400).

Test sonuçlarının değerlendirilmesiyle birlikte her test grubu için ortalama kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti bulguları Çizelge 3.6 ile Şekil 4.7. ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

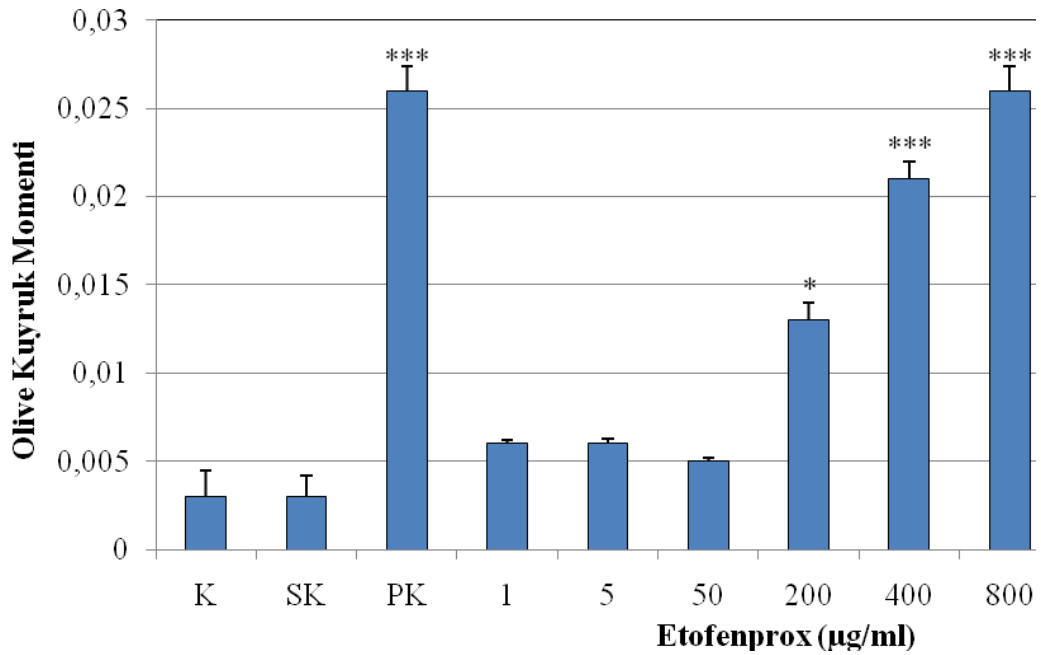
**Çizelge 3.6.** Çeşitli konsantrasyonlarda etofenprox’a maruz bırakılan CHO hücrelerindeki komet testine ait Ortalama Kuyruk Uzunluğu ve Olive Kuyruk Momenti değerleri.

Test maddesi	Dozlar (µg/ml)	Ortalama Kuyruk Uzunluğu ±SH	Ortalama Olive Kuyruk Momenti ±SH
Kontrol	----	0.00767 ± 0.00019	0.00322 ± 0.00014
SK (Etanol)	50 µl	0.00756 ± 0.00022	0.00291± 0.00012
PK (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	200 µl	0.05763 ± 0.00277	0.02550 ± 0.00139
Etofenprox	1 µg/ml	0.01063 ± 0.00048	0.00556 ± 0.00035
	5 µg/ml	0.01201 ± 0.00059	0.00626 ± 0.00035
	50 µg/ml	0.01063 ± 0.00032	0.00548 ± 0.00022
	200 µg/ml	0.02912 ± 0.00211	0.01326 ± 0.00107
	400 µg/ml	0.04660 ± 0.00275	0.02135 ± 0.00140
	800 µg/ml	0.05840 ± 0.00304	0.02633 ± 0.00149





**Şekil 4.7.** Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde komet testi ile belirlenen ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (K: Kontrol, SK: Solvent Kontrol, PK: Pozitif Kontrol) \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001



**Şekil 4.8.** Etofenprox'a maruz bırakılan CHO hücrelerinde komet testi ile belirlenen ortalama Olive kuyruk momenti değerleri (K: Kontrol, SK: Solvent Kontrol, PK: Pozitif Kontrol) \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

Etofenprox insektisitine maruz bırakılan izole CHO DNA'larındaki hasarın ölçülmesinde komet test tekniğinden yararlanılmıştır. Etofenprox tarafından yol açılan DNA hasarı sonucunda ortalama kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti değerlerinin kontrol grubuna göre artışı 200 µg/ml ( $P<0.05$ ) ile 400 ve 800 µg/ml'lik dozlarda anlamlı biçimde arttığı belirlenmiştir. Regresyon analizlerinde Kuyruk uzunluğu ( $R^2= 0.88$ ) ve olive kuyruk momenti ( $R^2=0.87$ ) değerlerinde görülen artışların doza bağımlı oldukları belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitinin çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir. Bu hareketlilik içerisinde pestisitlerin ya da metabolitlerinin hedef olmayan canlılar üzerindeki etkilerinin araştırılması üzerinde en yoğun çalışılan çevre sorunlarından birine ışık tutulması açısından önem taşımaktadır (Amr 1999).

Klasik toksisite çalışmaları yanında pestisitlerin genetik materyal üzerindeki etkilerinin çalışılması, yani genotoksisite testlerinin kullanımı, canlının ya da populasyonun genetik yapısında meydana gelebilecek olası değişimlerin tahmin edilebilmesini sağlayan bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır. Pestisitlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılmasında mikronükleus testi, çekirdek bölünme indeksinin yüzdelik oran tespiti ve son dönemlerde öne çıkan alkali komet testi en sık kullanılan testlerdir (Fenech, 2000, Gökalp, 2006, Sekihashi ve ark., 2003).

Bu çalışmada Etofenprox adlı pestisitinin in-vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmamızda insektisit Etofenprox bir Pretroit türevidir. Pretroitlerin diğer insektisitlere oranla insanlar için daha güvenli olması, düşük dozlarında dahi yüksek insektisidal etkiye sahip bulunması ve çabuk parçalanma gibi özelliklerinden dolayı, gittikçe artan geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur (WHO, 2005). Dolayısıyla pretroitler hakkındaki genotoksisite çalışmaları halk sağlığını ve çevreyi yakından ilgilendirmektedir.

Pretroitlerin genotoksik etkilerine dair yürütülen çalışmalar incelendiğinde, cyflutrin, cypermetrin, deltametrin, etofenprox, permetrin ve D-phenothrin türevleri ile yapılan in-vitro ve in-vivo çalışmalarda genel olarak negatif genotoksisite rapor edildiği görülmektedir (IPCS, 1990, 1994, 1996, 1997a–b, 2001). Yine bifentrin için birçok araştırmada negatif sonuç elde edilmesine rağmen fare lenfomaları ile yapılan iki çalışmadan birinde pozitif sonuca ulaşılmıştır (WHO, 2003). Ayrıca sıçanlarda yapılan

yüksek doza bağlı programlanmamış DNA sentezi sonuçlarında da genotoksik etki raporlanmıştır (IPCS, 1993) (Çizelge 2.2).

Son yapılan çalışmalar  $\lambda$ -cyhalotrin türevinin balıklarda mikronükleus, sıçanlarda kemik iliğinde kromozomal aberasyonları ve polikromatik eritrositlerde yine mikronükleus oluşumunu başlattığı rapor edilmiştir (Campana ve ark., 1999; Cavas ve ark., 2003; Celik ve ark., 2003). Bununla birlikte elde edilen veriler ışığında JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) cyhalotrin ve türevlerinin insana genotoksik bir zararı olmadığına karar vermiştir (IPCS, 2004a (Çizelge 2.2).

Çalışmamızda kullandığımız etofenprox'un mutajenik ve genotoksik etkilerine dair literatür taramaları sonucunda bilimsel makaleye rastlanmamış olup yalnızca rapor olarak sunulmuş çeşitli çalışma sonuçlarına rastlanabilmiştir. Bu sonuçlar arasında in-vitro olarak bakterilerde ve memeli hücrelerinde, in-vivo şartlarda ise sıçanlarda, ayrıca planlanmamış DNA sentez (UDS- unscheduled DNA synthesis) testi için insanda in-vitro HeLa hücreleri üzerinde rapor edilmiş bulgular bulunmaktadır (Çizelge 2.4).

Etofenproxun *mutajenik etkilerine* ait raporlar, Foster (1985) ve Seeberg (1985) tarafından yapılan çalışmaları aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz.

*Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538 suşlarına S9 aktivasyonu varlığı ve yokluğunda, 0 (DMSO), 200, 400, 800, 1600 ve 3200  $\mu\text{g}/\text{petri}$  halinde 72 saatlik % 96,3 saflıkta etofenprox uygulaması yapılmıştır. 3200  $\mu\text{g}/\text{petri}$ 'lik uygulamada çökme gözlemlenmiştir. Pozitif kontroller fonksiyonel olup revertant kolonilerde bir artış gözlemlenmemiştir (Foster, 1985).

Çin hamsteri V79 hücreleri, S9 sıçan karaciğer aktivasyonu varlığı ve yokluğunda, 0 (%1 dimetilsulfoksit), 9.75, 19.5, 39.0, 78.0, ve 156.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik konsantrasyonlarda üç saat süresince %96,3 saflıkta etofenprox'a maruz bırakılmışlardır. Çalışma sonunda 6-thioguanine rezistansı mutasyon frekansında artış tespit edilmemiştir (Seeberg, 1985).

Etofenprox'un kromozomal etkileşimlerine dair raporlar, Bootman ve arkadaşlarının 1985'te in-vivo olarak kobay farelerde ve in-vitro olarak insan erkek kanı lenfosit kültürlerindeki çalışmalarını takiben sunulmuştur.

15 adet CD-1 kobay fare, 0 (% 0.5 metilselüloz), 80, 400, ve 2000 mg/kg dozlarında %96,3 saflıktaki etofenprox'a oral yoldan maruz bırakılmışlardır. Kemik iliği mikronükleüs frekansları analiz edildiğinde pozitif kontrolün (klorambusil) fonksiyonel olup mikronükleuslu polikromatik eritosit sayısında bir artış olmadığı belirlenmiştir (Bootman ve ark., 1985).

Triplike insan erkek kanı lenfosit kültürleri, S9 sıçan karaciğer aktivasyonu varlığı ve yokluğunda, 0 (DMSO), 6.25,12.5, 25.0 ve 50.0 µg/ml oranlarında sırasıyla 2 ve 24 süresince %96.3 saflıktaki etofenprox'a maruz bırakılmış ve her bir konsantrasyondaki triplike kültürlerden 100 metafaz sayılmıştır. Pozitif kontrollerin fonksiyonel olduğu gözlemlenirken yapısal kromozom aberasyonlarında herhangi bir artış tespit edilememiştir (Bootman ve ark., 1985).

Etofenprox'un oluşturduğu *DNA hasarının* tespiti amacıyla Seeberg (1985) insan HeLa S3 hücrelerinde bir çalışma yürütülmüştür. Hücreler iki grup halinde 3 süresince %93 saflıkta etofenprox'a maruz bırakılmışlardır. Triplet tek tabaka kültürler [3H] timidin eklentili iki grup olarak çalışılmıştır. Birinci grup sıçan karaciğeri S9 karışımı varlığında 0 (DMSO), 2.44, 4.88, 9.75, 19.5, ve 39.0 µg/ml çözeltileri halinde, diğer grup ise S9 olmadan 0 (DMSO), 9.75, 19.5, 39.0, 78.0, ve 156 µg/ml içerikli olarak maruziyet sağlanmıştır. Sonuçta planlanmamış DNA sentezinde artış tespit olmadığı rapor edilmiştir (Seeberg, 1985).

Etofenprox'un karsinojenik etkileri ile ilgili olarak geçtiğimiz yıl yayınlanan bir çalışmada, Hojo ve arkadaşları (2012), etofenprox'un sıçan karaciğerlerinde tümör oluşturma potansiyeli araştırılmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre etofenprox'un CAR adı verilen reseptörleri aktive ettiği ve mikrosomal ROS üretimini artırarak oksidatif strese neden olduğu böylece hücrel proliferasyonu hızlandırmak suretiyle tümör oluşumunu tetiklediği öne sürmüştür.

Tüm bu veriler ışığında etofenprox, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (U.S. Environmental Protection Agency- EPA) tarafından düşük riskli ve insan için karsinojenik olmayan pestisit olarak tanımlanmıştır ([http://www.epa.gov/pesticides/chem\\_search/cleared\\_reviews/csr\\_PC-128965\\_9-Jun-08\\_a.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-128965_9-Jun-08_a.pdf), 2013).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (International Agency for Research on Cancer - IARC) tarafından yayınlanan listede ise etofenprox, Grup-4 kategorisinde belirtilmiş olup, muhtemelen karsinojenik olmayan kimyasallar arasında kabul edilmiştir (UNEP 2007).

Çalışmamızda hücre siklusu kinetiklerinin belirlenmesinde bir parametre olan ÇBİ'den sitotoksik etkileri belirlemek üzere faydalanılmıştır. Etofenprox'un ÇBİ bağlamında sitotoksik etkisine ancak yüksek dozlarda rastlanmıştır. Buna göre etofenprox'un hücre siklusu ilerlemesindeki inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kayıp oluşturabilmesi ancak organizmaların çok yüksek seviyede bir maruziyeti ile mümkün olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda mikronükleus testi, hücre bölünmesi esnasında asentrik kromozom fragmentleri veya tüm bir kromozom kayıpları bağlamında oluşan MN'lerin skorlanmasına dayalı olarak etofenprox'un genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Etofenprox'un kromozomal etkileşimleri, Bootman ve arkadaşlarının 1985'te yürütülen in-vivo çalışmada olarak kobay farelerde mikronükleuslu plikromatik eritrosit sayısında bir artış tespit edilemediği belirtilmiş olup söz konusu çalışmada etofenprox miktarı en fazla 50.0 µg/ml olarak dozlanmıştır. Bizim çalışmamızda en yüksek değer olarak onaltı kat artırılarak 800 µg/ml olarak belirlenmiştir. Skorlanan mikronükleusların 50, 200, 400 ve 800 µg/ml'lik dozlarda anlamlı seviyede bulunduğundan, etofenprox'un ancak çok yüksek dozlarda genotoksik hasara yol açabileceği sonucuna varılmıştır.

Etofenprox'un oluşturduğu *DNA hasarının* tespiti amacıyla Seeberg (1985) insan HeLa S3 hücreleri ile çalışarak en yüksek doz olarak 156 µg/ml kullanmış ve tüm denemelerde negatif sonuçlar elde etmiştir. Etofenprox'un oluşturduğu tek iplik DNA kırıklarını belirleyebilmek ve daha duyarlı bir genotoksisite ölçümü için, literatürde ilk defa alkali komet testi bu çalışmada kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda komet testi parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve olive kuyruk momenti değerleri seçilerek DNA

tek iplik kırıklarının miktarı araştırılmıştır. Pozitif kontrol ( $H_2O_2$ ) fonksiyonel olup Etofenprox'un 200, 400 ve 800  $\mu\text{g/ml}$ 'lik yüksek dozlarda DNA hasarı oluşturduğu tespit edilmiştir.

Etofenprox'un genotoksik etki mekanizmasına ait olarak sınırlı bilgiye rastlanabilmiştir. Hojo ve arkadaşlarının (2012) sıçanlarla in-vivo yaptıkları deneylerde etofenprox'un karaciğerde tümör oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Kısmi hepatektomi ile alınan karaciğer örneklerinde glutasyon S-transferaz enzimine ait artışların yanında kantitatif Real-time PCR sonuçlarına göre Faz-I ve Faz-II enzimlerine ait mRNA ekspresyonundaki artışları tespit etmişlerdir. Son olarak hepatositlerde sitoplazmada oluşan yüksek ROS içerikli mikrozomların çekirdeğe, etofenprox tarafından transloke edilen CAR adlı zar proteinleri ile alınarak proliferatif genleri etkilediği sonucuna varmışlardır.

Etofenprox'un çevresel konsantrasyonları ile ilgili bilgiler de sınırlı olmakla birlikte ülkemizde Kızılırmak deltasında gerçekleştirdikleri çalışmada, Yurtkuran ve Saygı (2013) suda 0.001–0.008  $\mu\text{g/L}$ 'lik bir etofenprox kalıntısı tespit ederken sedimentte ise bu miktarın 9.5 ve 385  $\mu\text{g/kg}$  arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Etofenprox'un tarla uygulamalarında domates bitkisi üzerindeki kalıntı değerleri 0.01, 0.1 ve 0.5  $\text{mg/kg}$  olarak bulunmuştur (Malhat ve ark., 2012). Etofenprox'un pH, toprak tipi ve organik içeriğe bağlı olarak yarılanma ömrü 13 ila 37 gün arasında olduğu ve bu çok yüksek biyokonsantrasyon karakterinin, düşük konsantrasyonlarda da olsa etofenprox'un çevrede uzun bir periyotta kalmasına neden olacağı rapor edilmiştir. (Sun ve ark., 2012). Çalışmamızda genotoksik etkiye sebep olabilecek dozları (200, 400 ve 800  $\mu\text{g/ml}$ ) ile en yüksek su ( $8 \times 10^{-6}$   $\mu\text{g/ml}$ ) , sediment (385  $\mu\text{g/kg}$ ) ve bitkisel (500  $\mu\text{g/kg}$ ) çevre konsantrasyonları karşılaştırıldığında, Etofenprox'un olası çevresel konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip olmadığı sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak etofenprox'un çin hamsteri ovaryum hücrelerinde (CHO) uygulanan yüksek dozlarının çekirdek bölünme indeksini düşürüp, mikronükleus frekanslarını ve komet parametrelerinde istatistiksel olarak önemli artışlara sebep olduğu ve DNA hasarını artırdığı belirlenmiştir. Etofenprox, genotoksik etkisini sitoplazmada mikrosomal ROS türevlerinin üretimini destekleyip, doğrudan çekirdeğin içine

taşınmasını sağlayarak gerçekleştirdiği söylenebilir. Bir diğer mekanizmada ise etofenprox'un yüksek konsantrasyonlarda apoptotik etki göstermek sureti ile bu hasarlara yol açabilmesi de mümkündür. Elde ettiğimiz bulgulara göre etofenprox'un klastojenik, mutajenik, anojenik etkiye sahip olduğu görülmektedir. DNA'da hasar olarak ortaya çıkan bu genotoksik etkiler kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle bu pestisit kullanımında dikkatli davranılmalı, hedef alınmayan canlıların özellikle insanların bu kimyasal bileşiklere maruz kalması mümkün olduğunca azaltılmalıdır.

Her gün istemli veya istemsiz olarak insanların maruz kaldığı pestisitlerin pek çoğunun toksisite testleri araştırılmayı beklemektedir. Kullanılmakta olan bu pestisitlerin asıl amacı çeşitli zararlıları öldürmek ve üretimi artırmak olsa da büyük bir dezavantaj olarak karşımıza hedef dışı canlılarda sebep olduğu ölümler, zehirlenmeler, teratojenik ve kanserojenik etkiler çıkmaktadır. Son zamanlarda artan kanser vakaları ve sakat doğumlar da bu sonuçları desteklemektedir. Üç farklı test sistemi kullanılarak yaptığımız çalışmada etofenprox pestisiti için sonuçların güvenilirliği arttırılmıştır. Bu çalışmada yer almayan diğer genotoksikite test sistemleri kullanılarak sonuçların desteklenebileceği düşüncesindeyiz.



## KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M. 2001.** The *in vitro* micronucleus assay. In Choy WN, eds. Genetic toxicology and cancer risk assesment. *Marcel Dekker*: 163 – 186, New York.
- Adamou, R., Coly, A., Abdoulaye, A., Soumaila, M., Moussa, I., Ikhiri, K., Tine, A., 2011.** Photochemically-induced fluorescence dosage of non-fluorescent pyrethroid (Etofenprox) in natural water using a cationic micellar medium. *J Fluoresc.*, 21(4):1409-15.
- Ağar, S.,1990.** Pestisitlerin çevreye olan etkileri ve önlemleri.Çevre Biyolojisi Sempozyumu Bildiri ve Poster Özetleri (17-19 Ekim) Ankara, 83 s.
- Anderson, D., T., W., Browne, M., A., 1997.** The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorosence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mutat. Res.*, 390. 69-77.
- Amr, M.M., 1999.** Pesticide monitoring and its health problems in Egypt, a Third World Country. *Toxicol. Lett.*, 107(1-3): 1-13.
- Anonim, 2007.** Pesticides: Health and Safety. National Assessment of the Worker Protection Workshop -3. U.S. Environmental Protection Agency, 2007, USA.
- Anonim, 2008.** Study confirms Parkinson's-pesticides link, Reuters, April 18, 2008. <http://www.reuters.com/article/healthNews/idUSCOL87119020080418>. -(Erişim tarihi: 24.03.2012).
- Anonim, 2009.** Secretariat of the Stockholm Convention; "Measures to reduce or eliminate POPs" (PDF), Geneva. [http://chm.pops.int/Portals/0/docs/publications/sc\\_factsheet\\_001.pdf](http://chm.pops.int/Portals/0/docs/publications/sc_factsheet_001.pdf). -(Erişim tarihi: 16.01.2013).
- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., McCullough, M.L., Calle, E.E., Schwarzschild, M.A., Thun, M.J., 2006.** Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/112660877/ABSTRACT>. -(Erişim tarihi: 04.01.2013).
- Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., Lebailly, P., Brochard, P., Fabrigoule, C., 2010.** Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER Study. *Occup Environ Med* 68 (2): 108–115.
- Barbee, G., C., Stout, M., J.,2009.** Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest. Manag. Sci.*, 65(11):1250-1256.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., 2010.** Mosquitoes and Their Control. Springer. <http://books.google.com/books?id=JifgVr1f4IQC&dq>. Retrieved 2011-04-13. -(Erişim tarihi: 30.01.2013).

**Beseler, C.L., Stallones, L., Hoppin J.A., 2008.** Depression and pesticide exposures among private pesticide applicators enrolled in the Agricultural Health Study". Environ. Health Perspect. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=2599768>. -(Erişim tarihi: 12.12.2012).

**Bootman, J., May, K., 1985.** MTI-500  $\alpha$ -CO: Assessment of its Mutagenic Potential in Amino-Acid Auxotrophs of Salmonella typhimurium and Escherichia coli", Life Science Research Limited, Eye, Suffolk, England, LSR Report No. 85/MT0020/433.

**Bulut, H., Tamer, A., 1996.** Pestisit kullanımının azaltılması ile ilgili politika ve stratejiler. II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, 12.24.1996, Ankara.

**Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 1999.** Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish Cheirodon interruptus interruptus. Mutat. Res., 438:155–161.

**Cavas, T., Ergene-Gozukara, S., 2003.** Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. Mutat. Res., 534:93–99.

**Celik, A., Mazmanci, B., Camlica, Y., Askin, A., Comelekoglu, U., 2003.** Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. Mutat Res., 539:91–97.

**Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T. 1996.** Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat. Res.*, 349: 43 – 50.

**Choy, W.N. 2001.** Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, 163 – 186, New York.

**Collins, A. R., Dobson, V. L., Duinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., 1997.** The comet assay: what can it really tell us?. *Mutat. Res.*, 375: 183-193.

**Coşkun, M. 2013.** Fulleren Nanopartiküllerinin Radyasyona Maruz Bırakılan A549 İnsan Akciğer Epitel Hücreleri Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Mikronükleus Ve Gh2ax Test Yöntemleri Kullanılarak Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

**Dağ, S., 2000.** Türkiye' de Tarım İlaçları Endüstrisi ve Geleceği, V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri 2. Cilt, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, s. 933-958, 17-21 Ocak 2000.

**Dağlıoğlu, N., 2004.** Akut Organofosfatlı Pestisit Entoksikasyonlarının Sıçanlarda Deneysel Olarak Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 8-20 (2004).

**De Lorenzo, M., E., De Leon, R., G., 2010.** Toxicity of the insecticide etofenprox to three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58(4):985-90.

**Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., 2005.** Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, 35-45.

**Demir, E., Kocağoğlu, S., Kaya, B., 2008.** Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Food. Chem. Tox.* 46(3):1034-41.

**Demirel, S., Zamani, A. 2002.** MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3): 123 – 127.

**Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R. et al. 1997.** Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*; 12: 227 – 231.

**Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989.** Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*; 13: 34 – 43.

**Ecobichon, D.J., 1996.** Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (Klaassen CD, Doull J, eds). 5th ed. *MacMillan*, 643–689, New York.

**EPA, 1985.** Guidelines for the registration and control of pesticides. EPA, 29s.

**Fabre, K., M., Saito, K., Degraff, W., Sowers, A.L., Thetford, A., Cook, J.,A., Krishna, M., C., Mitchell, J., B., 2011.** The effects of resveratrol and selected metabolites on the radiation and antioxidant response. *Cancer Biol Ther*, 12(10):915-23.

**Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O’Neill, K. L. 1995.** The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339: 37–59.

**FAO, 1987.** FAO News, World Food Day. 16 October.,4 s.

**FAO, 1989.** FAO Trade Commerce. 43,380 s.

**Fenech, M., Morley, A.A. 1986.** Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res.*, 161: 193 – 198.

**Fenech, M., 2000.** The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.*, 455: 81 – 95.

**Fenech, M., 2007.** Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084 – 1104.

- Foster, D.E., and Wintersteen, W.K. 1986.** Insectic Acaric Tests. *Stalk Borer Control*, 11: 230-231.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C., 2006.** Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5): 2315-9.
- Garcia, A.M., Benavides, F.G., Fletcher, T. and Orts, E. 1998.** Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, 24 (6): 473-480.
- Garewal, H.S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J. 1993.** Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*; 17: 206 – 212.
- Gilden, R.C., Huffling, K., Sattler, B., 2010.** Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.*, 39 (1): 103–10.
- González, N., V, Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M., L., 2011.** A combination of the cytokinesis micronucleus cytome assay and centromeric identificatio for evaluation of the genotoxicity of dicamba. *Toxicol Lett.*, 207(3):204-12.
- Gökalp, M.F.D., 2006.** Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Hayashi, M., Mac Gregor, J.T., Gatehouse, D.G., Adler, I.D., Blakey, D.H., Dertinger, S., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Sutou, S., 2000.** In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: Aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. A report from the international work shop on genotoxicity test procedures (IWGTP). *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 234-52.
- Hayashi, K., Nakae, A., Fukushima, Y., Sakamoto, K., Furuichi, T., Kitahara, K., Miyazaki, Y., Ikenoue, C., Toda, T., 2010.** Contamination of rice by etofenprox, diethyl phthalate and alkylphenols: effects on first delivery and sperm count in mice. *J Toxicol Sci.* 35(1):49-55.
- Heddle, J., 1973.** A rapid in vivo test for chromosome damage . *Mutat. Res.*, 18: 187-90.
- Heddle, J., A., Countryman, R., I., 1976.** The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res.*, 41: 321 – 332.
- Hojo, Y., Shiraki, A., Tsuchiya, T., Shimamoto, K., Ishii, Y., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K., 2012.** Liver tumor promoting effect of etofenprox in rats and its possible mechanism of action. *Japan Toxicol. Sci.*, 2012;37(2):297-306.
- Högstedt, B., Karlsson, A. 1985.** The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res.*, 156: 229 – 232.

**IPCS – International Programme on Chemical Safety , 1990.** d-Phenothrin. Environmental Health Criteria 96. Geneva, World Health Organization (WHO).

**IPCS – International Programme on Chemical Safety, 1993.** Bifenthrin. In: Pesticide Residues in Food. Evaluations 1992. Part II – Toxicology. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Geneva, World Health Organization (WHO/PCS 93.34):79–102.

**PCS – International Programme on Chemical Safety, 1994.** Etofenprox. In: Pesticide Residues in Food. Evaluations 1993. Part II – Toxicology. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Geneva, World Health Organization (WHO/PCS 94.4):215–232.

**IPCS – International Programme on Chemical Safety, 1996.** Cypermethrin and  $\lambda$ -Cypermethrin. In: Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. Prepared by the forty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, World Health Organization (WHO Food Additives Series No. 38):133–170.

**IPCS – International Programme on Chemical Safety, 1997 a.**  $\lambda$ -Cypermethrin. Geneva, World Health Organization (Environmental Health Criteria No. 142).

**IPCS –International Programme on Chemical Safety, 1997 b.** Cyfluthrin. In: Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. Prepared by the forty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, World Health Organization (WHO Food Additives Series No. 39):79–106.,

**IPCS– International Programme on Chemical Safety, 2001.** Deltamethrin. In: Pesticide Residues in Food. Evaluations 2000. Part II – Toxicological. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Geneva, World Health Organization (WHO/PCS 01.3):79–110.

**Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., 2000.** Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 463: 13–31.

**Keshava, C., Keshava, N., Whong, W-Z., 1997.** Inhibition of methotrexate-Induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 17: 313-326.

**Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997.** The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res.*, 392(1-2): 19 – 30.

**Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I., 2003.** Indirect mechanisms of genotoxicity . *Toxicol Lett*, 140-141: 63-74.

**Klassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., 2001.** Casarett and Doull's Toxicology: Basic Science of Poisons. 6th Edition, McGraw-Hill International Editions, New York, 763–784 (2001).

**Klaude, M., Eriksson, S., Nygren J., Ahnström, G., 1996.** The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363: 89-96.

**Korkmaz, S., K., A., Üstün, G., E., Çiner, F., Azak, H., S., 2011.** Sularda pestisit kirliliği ve yasal uygulamalar.1. Ulusal Kıyı Bölgelerinde Çevre Kirliliği ve Kontrolü Sempozyumu, 17-20 Kasım, 2011, Çorlu, İstanbul Türkiye.

**Krishna, G., Hayashi, M. 2000.** In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*; 455: 155 – 166.

**Li Chen, T., Wise, S.,S., Kraus, S., Shaffiey, F., Levine, K.M., Thompson, W.D., Romano, T., O'Hara, T., Wise, J.P., 2009.** Particulate hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung and skin fibroblasts. *Environ Mol Mutagen.*, (5):387-93.

**Lima, P., D., L., Yamada, E., S., Costa., E., T., Pessoa, C., O., Rabenhorst, S., H., B., Bahia, M., O., Lu, F., C., 1991.** Toxicity of pesticides, Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment. 2nd Edition, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 277-292.

**Liu, W., Di Giorgio, C., Lamidi, M., Elias, R., Ollivier, E., De Méo, M.,P., 2011.** Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. *J Ethnopharmacol.*, 137(1):176-83.

**Lorge, E., Lambert, C., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Delonges, L., Claude, N., 2007.** Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicol Sci.*, 96(2): 214 – 217

**Lukamowicz, M., Kirsch-Volders, M., Suter, W., Elhajouji A., 2011.** In vitro primary human lymphocyte flow cytometry based micronucleus assay: simultaneous assessment of cell proliferation, apoptosis and MN frequency. *Mutagenesis*, 26(6):763-70.

**Malhat, F., Abdallah, H., Nasr I., 2012.** Estimation of Etofenprox Residues in Tomato Fruits by QuEChERS Methodology and HPLC–DAD. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 88:891–893

**Marrs, T. C., Dewhurst, I., 2000.** “Toxicology of pesticide”, General and Applied Toxicology, Ed. B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen, 2. Edition, Macmillan Reference Ltd., New York, 1993-2012.

**Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M., 2006.** Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88: 1515-31.

**McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P., Collins, A., 1993.** "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a european review", *Mutat. Res.*, 288: 47-63

**McCauley LA, Anger WK, Keifer M, Langley R, Robson MG, and Rohlman D., 2006.** "Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides"]. *Environmental Health Perspectives* 114 (3): 953-960. doi:10.1289/ehp.8526. <http://www.ehponline.org/members/2006/8526/8526.html>. Retrieved 2007-09-15.)

**Montgomery, M., P., Kamel, F., Saldana, T., M., Alavanja, M., C., Sandler, D., P., 2008.** Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. *Am J Epidemiol.*, 167 (10): 235-46.

**Montgomery, J., H., 1995.** Agrochemicals Desk Reference: Environmental Data, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 613 pp.

**Mueller S., Yang X., Sottero T.L., Gragg A., Prasad G., Polley M.Y., Weiss W.A., Matthay K.K., Davidoff A.M., DuBois S.G., Haas-Kogan D.A., 2011.** Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: efficacy and underlying mechanisms. *Cancer Letters* 306(2): 223-9.

**Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. 2005.** Clonogenic Cell Survival Assay. Methods in Molecular Medicine, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays Edited by: R.D. Blumenthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

**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: 69-72.

**Ostling, O., Johanson, K. J., 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 123: 291-298.

**Öncüer C., 1995.** Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. İzmir B.B., İzmir, 193 sayfa.

**Prasad G., Sottero T., Yang X., Mueller S., James C.D., Weiss W.A., Polley M.Y., Ozawa T., Berger M.S., Aftab D.T., Prados M.D., Haas-Kogan D.A., 2011.** Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol* 13(4): 384-92.

**Robert, B., Wallace, M., R., 1992.** Moses, Marine, Pesticides. Last Public Health and Preaveptive Medicine. 13. th ed. Prentice Hail mt Co.NewYork, 913 pp.

**Saito, N., 1987.** Safe use programme of agricultural chemicals in Japan. *Japan pesticide Information*, 51, 3-8.

**Sevil, A., Aydınöğlu, H., Temel, O., İıkizüenal, K., Ece, H., 1991.** Pestisitlerin kullanımının tarihçesi,bugünü ve geleceği. *Türk entomol. derg.*, 15 (4): 247-256.

**Sanborn, M., Kerr, K., J., Sanin, L., H., Cole, D., C., Bassil, K., L., Vakil, C., 2007.** Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Can Fam.*, 28: 16 – 32.

**Schmid, W., 1975.** The micronucleus test. *Mutat Res*; 31: 9 – 15.

**Seeberg, A., H., 1985.** Gene Mutation in Chinese Hamster V79 Cells. Life Science Research, Roma Toxicology Centre, Rome, Italy, LSR-RTC Report No.162002-M-06985, 22 Ağustos 1985.

**Seeberg, A., H., 1985.** Unscheduled DNA synthesis in human cells, cell line: Hela S3, Test substance MTI-500. Life Science Research Roma Toxicology Centre, Italy; report no. 162003-M-05785, 30 Temmuz 1985.

**Sezer, B., 2002.** Metal içeren bazı pestisitlerin alevli atomic absorbisyon spektrometrisiile tayini. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri, Ankara, 10-30(2002).

**Sheiner, E., K., Sheiner, E., Hammel, R., D., Potashnik, G., Carel, R., 2003.** Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health* 41 (2): 55–62.

**Sekihashi, K., Saitoh, H., Saga, A., Hori, K., Nakagawa, M.,Miyagawa, M., Sasaki, Y. F., 2003.** Effect of in vitroexposure time on comet assay results. *Environ., Mutagen., Res., Commun.*, 25 (2): 83–86.

**Singh, N., P., McCoy, M., C., Tice, R., Schnider, E., L., 1998.** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184–191.

**Soderlund D.M., Clark J.M., Sheets L.P., Mullin L.S., Piccirillo V.J., Sargent D., Stevens J.T., Weiner M.L., 2002.** Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171:3–59.

**Soykan, H., 2007.** Dichlorvos'un (DDVP) Allium cepa L. kök ucu meristem hücrelerinde mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Aydın, 4-11 (2007).

**Stopper, H., Müller, O.,S., 1997.** Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol. In Vitro*, 11: 661 – 667.



**Sun, D., Li, L., Liang, H., Li, W., Ji, R., Wu, Y., Liu, C., 2012.** The dissipation of ethofenprox in cabbage and soil under open conditions. *Environ. Mon. Assess.*, 184(9):5743–5747

**Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., 1995.** Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*; 341: 169 – 184.

**Şekerlioğlu, Z. A., Şekerlioğlu, V., 2011.** Genetik Toksikite Testleri. *TÜBAV Bilim Derg.*, 4-3, 221-229.

**Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000.** Single cell gel/Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221

**Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvarham, S., Osorio, A.,M., et al., 1997.** Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res.*, 388(1): 85 – 95.

**Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., 2010.** “Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi”, 26(2): 154-169.

**Toros, S., 1999.** Tarımsal Savaş Yöntemi ve İlaçları. Ankara B.B., Ankara, 165 sayfa.

**Turabi, M.S.,2007.** Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması. Tarım İlaçları Kongre 168 ve Sergisi, TMMOB Zir. Müh Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası, Bildiriler Kitabı, s:50-61, 25-26 Ekim 2007.

**United Nations Environment Programme (UNEP), 2007.** Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Persistent Organic Pollutants Review Committee Third meeting. Geneva, 19–23 November, UNEP/POPS/POPRC.3/12.

**Uslu, O., Türkman, A., 1987.** Su kirliliği ve kontrolü. T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi:1, Ankara, 118-125.

**Ünal, Y., 1998.** Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekni\_i ile ara\_tırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-87.

**Ünal, G., Gürkan, M., O., 2001.** İnektisitler kimyasal yapıları, toksikolojileri ve ekotoksikolojileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara, 242 sayfa.

**Van Maele-Fabry, G., Lantin, A., C., Hoet, P., Lison, D., 2010.** Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 21 (6): 787–809.

**Vanparys, P., Vermeiren, ., Sysmans, M., Temmerman, R., 1990.** The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res.*, 244: 95 – 103.

**Vasquez, M., E., Holstege, D.,M., Tjeerdema, R., S., 2011.** Aerobic versus Anaerobic Microbial Degradation of Etofenprox in a California rice field soil. *J Agric Food Chem.*, 59(6):2486-92.

**Von Ledebur, M., M., Schmid, W., 1973.** The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res.*, 19: 109 – 117

**Vural, N., 2005.** Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, Ankara.

**Ware, G.W., 1980.** Pesticides: Chemical Tools. *Pesticides Theory and Application*, New York, 3-15.

**World Health Organization (WHO), 2005.** Safety of Pyrethroids for Public health use. Geneva, WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.10.

**Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A. 2001.** Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, 77: 631 – 636

**Worthing, C. R., 1987.** The Pesticide Manual. *A World compendium*, Great Britain, 1077 s.

**Yurtkuran Z., Saygı Y., 2013.** Assessment of Pesticide Residues in Karabog̃az Lake from Kızılırmak Delta, Turkey. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 91:165–170

**Yırtıcı, Ü., 2007.** Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.

**Young, R.R., 2002.** Genetic toxicology. *Toxicology*, 173, 103-21.

**Zaim, M., Jambulingam, P., 2004.** Global insecticide use for vector-borne disease control, 2nd ed. Geneva, World Health Organization (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2004.9).

**Zeiger, E., 2004.** History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal. *Environ. Mol. Mutagen.*, 44: 363-71.

**Zhang, Z.Y., Wang, D.L., Chi, Z.J., Liu, X.J., Hong, X.Y., 2008.** Acute toxicity of organophosphorus and pyrethroid insecticides to *Bombyx mori*. *J Econ Entomol.*, 101(2):360-4, 2008.

## **EK 1.**

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimince “Etofenprox' un Genotoksik Etkilerinin Çin Hamsteri Ovaryum Hücrelerinde Mikronükleus ve Komet Testleri Kullanılarak Araştırılması” başlıklı proje ile (**Proje no: HDP(F)-2012/20**) desteklenmiştir.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı: Faysal YILMAZ**

**Doğum Yeri ve Tarihi: Kütahya /TÜRKİYE – 31.01.1977**

**Yabancı Dili: İngilizce**

**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise: Kütahya Atatürk Lisesi / 1990 – 1994**

**Lisans: K.T.Ü. F.E.F. Biyoloji Bölümü / 1994 – 1999**

**İletişim (e-posta) : faysal1774@gmail.com**

<b>Çalıştığı Kurumlar</b>	<b>Görev</b>	<b>Yıl</b>
British Curriculum - International Schools	Head of Biology Department -Eastern Asia	2000-2009
AP Curriculum – International Collages	Consular of Biology Department – North & Central Africa	2009-2010
AP Curriculum – Regional Management	Chef of Biology Consultants – Turkey/Marmara Region	2010-
<b>Çalıştığı Organizasyonlar</b>		
IBO –International Biology Olympiad	Team Leader	2005-2008
IBO –International Biology Olympiad	Country Coordinator	2008-2010
ISO-International Science Olympiad	General Secretary	2010-2011
ISO-International Science Olympiad	Country Coordinator	2011-

<b>Tez ve Proje Çalışmaları</b>	<b>Yıl</b>
<i>Escheria coli</i> JM01’de Termofilik <i>Bacillus falavotermus</i> (AB03, AB04, AB05) Suşlarına ait Peroksidaz Genlerin’in Klonlanması ve Baz Sırası Tayini	1999
Günümüz Gen Tedavi Yöntemleri	2000
Genomik ve Moleküler Araştırmalar Bakımından İnternet ve Databanklar	2000
Investigation of Iodine Concentration and Antimicrobial/fungal Effects of <i>Allium rosenbachianum</i>	2004
First Livestock-Poultry-Fish Complex Instruction and Managements in Central Asia – <i>Eco-ecologic Solutions</i>	2005
<i>Bacillus thurugiensis</i> Endospore Crystals Against <i>Malacosoma paralellum</i> Parasite - Bioinsecticide	2006
Using Anaerobic Bacterial Flora of Lake Sediment for Bioelectricity Production - <i>Electricity from Mud</i>	2007
A Novel Remediation Method for Heavy Metal Polluted (Cu&Cr) Soils by Microscopic Fungus and Common Vegetables	2008
Investigation of Lead (Pb) Effects on Skin Elasticity by Young Modulus	2009
Brassinosteroid Yapılı İnsan Hormonlarının Bitki Gelişimine Olan Etkilerinin Araştırılması	2010
Yemekhane Gürültüsünün Yeme Süresine Olan Etkilerinin Araştırılması	2011
Nanopestisitler	2012
Bursa Mudanya-Tepedevrent Mevkii Serpentlerinin Sınıflandırılması ve Çevresel Peyzaj Değişikliklerinin Etholojik Etkilerinin İncelenmesi	2012
Bitkisel Hormon Yolakları ile İnsan Kanser Yolaklarının Benzerliklerinin Belirlenmesi ve Yeni Tedavi Yolları	2012
Küf Mantarları ve Yemeklik Sebzelerin, Cu ve Cr Ağır Metallerini Toprakta Absorblama Kapasitelerinin Araştırılması- <i>Myco/Phyto Temizleme</i>	2012
Blind Guiding Robot-Aurdino Based Multiple Purposed Robot	2013