

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOMİL VE İNDOKSAKARB İÇEREN BAZI PREPARATLARIN FARE
KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİYLE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Muhammet DEMİR

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Ayşe KANICI

2014-KARS

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Muhammet DEMİR tarafından hazırlanmış olan *Metomil ve İndoksakarb İçeren Bazı Preparatların Fare Kemik İliği Hücrelerinde Mikronükleus Yöntemiyle Genotoksik Etkilerinin Araştırılması* adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy **birliği**..... ile **Kabul**... edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2014

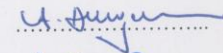


Adı Soyadı:

Başkan : Prof. Dr. Abdullah DOĞAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşe KANICI

Üye : Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU

İmza:


.....

.....

.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serpil DAĞ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih 24.06.2014

Muhammet DEMİR

ÖNSÖZ

Bu çalışmada metomil ve indoksakarb'ın farelerde görülen genotoksik etkileri araştırılmıştır. Dünya nüfusu her geçen gün giderek artmaktadır. Artan bu nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için tarım ürünlerinden daha fazla verimin alınması gerekmektedir. Bu gereklilik insan ve hayvanların sağlıklı bir şekilde beslenmeleri için şarttır. Bu amaçla yeterli derecede tarımsal üretimin, sağlıklı bir şekilde elde edilmesi büyük bir önem arz etmektedir. Tarımsal üretimi artırmanın ilk şartı iyi bir genetik ürüne sahip olmaktır. Ancak bu yalnız başına yeterli değildir. Ürünlerin ekildiği yeteri büyüklükteki alanlara da ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden iyi bir çevre planlaması yapılmalıdır. Tarımsal alanların yerleşime açılmaması ve kirliliklerden korunması şarttır. Ayrıca ürünlerin ekildiği toprağın korunması ve topraklardan bilinçli olarak yararlanılması gerekir. Bu anlamda gübreleme ve sulama faaliyetlerine özellikle dikkat edilmelidir. Yanlış ve yaygın yapılan gübrelemeler toprağın doğal yapısının bozulmasına neden olduğundan tarımsal üretimi hem sağlık hem de miktar açısından olumsuz kılmaktadır. Özellikle yer altı sulamaları zaman içerisinde toprağın tuz oranını artırarak verimi olumsuz yönde etkilemektedir. Yine kirlilik taşıyan suların toprağa verilmesi bitkisel üretimin kalitesini düşürmektedir. Böyle ürünler istenmeyen maddeleri yapılarında taşıyabileceğinden tüketicilerin sağlığını olumsuz yönde etkilemesi daima söz konusu olabilir. Hayvanlara yansıyan bu kirlilikler hayvan sağlığını ve dolaylı olarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Günümüzde azalan tarım alanlarından daha fazla verim artırmak için ürünlerin korunması da özellikle 1950'li yıllardan sonra gündeme gelmiştir. Bu amaçla tarım ürünlerine zarar veren canlılara karşı çeşitli kimyasal maddelerin kullanıldığı görülmektedir ki, bunlara genel anlamda pestisitler adı verilir. Verimi artırmak için tarım ürünlerine günümüzde pestisit uygulanması maalesef zorunlu görülmektedir. Bu uygulamalar bitkilerin üretim safhasından sofraya gelinceye kadar ki herhangi bir zamanını kapsar. Buradaki amaç ürünlerin bozulmasının önlenmesinin yanında ikinci bir durumda söz konusudur. Bu durum ürün daha tarla da iken zararlılara karşı korunmasının yapılmasıdır. İlaçlamalar ürünün hem yetiştirme esnasında hem de yetiştikten sonra tüketilinceye kadar bozulmasının önüne geçilmesini amaçlamaktadır. Bu yüzden özellikle böceklere karşı kullanılan ve insektisit adı verilen ürünlerin kullanımı günümüzde oldukça yaygın bir durumdur. Her ilaç için söz konusu olan uygun doz gerekliliği bu ilaçlar için de söz konusudur.

Çünkü uygun dozların üzerinde verilen her ilacın zehir etkisi göstermesi içten bile değildir.

İnsanoğlu son yıllarda tarım alanlarından daha fazla yararlanabilmek için genetiği değiştirilmiş ürünlere de başvurmuştur. Bir bitkiye genelde bakteri geninin aktarılması ile elde edilen bu ürünlerin zararları tartışmalara yol açmaktadır. Bu ürünler fiziksel anlamda ana ürüne benzemekte ama biyokimyasaları ana üründen farklılık göstermektedir. Böceklerle dayanıklı olan bu ürünler daha uzun sürede bozunmakta ve kendilerinden ana ürüne göre hacim olarak daha fazla verim alınabilmektedir. Ancak taşıdıkları yüksek glikoprotein oranları nedeniyle tüketilmeleri ciddi sorunlara neden olabilir.

Bu çalışmada kullanılan metomil ve indoksakarb karbamat grubunda bulunan insektisitlerdendir. Bu maddelerin gereksiz ya da gereğinden fazla kullanılması hem canlılar hem de doğa için vahim sonuçlar doğurabilir. Bu ürünler kullanıldığında zararlı etkilerini hemen ya da daha uzun sürede ortaya çıkarabilirler. Yani bir akut ya da kronik zehirlenme tablosu sergileyebilirler. Bazı uygulamalar zararlı etkilerini hemen göstermese bile toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda birikim yaparak yıllar sonra ortaya çıkarabilirler. Bu konuda ciddi zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Bu yüzden kullanılmaları esnasında çok dikkat edilmesi gereken maddelerdir. Bilimsel olarak belirlenen süreler ve dozlarda kullanılmak zorunluluğu ve sorumluluğu her kullanıcı için geçerlidir.

Bu çalışmada bu ürünler hakkında genel bilgiler verilecek ve muhtemel genotoksik etkileri araştırılacaktır. Yapılan bu laboratuvar çalışmasıyla toplumu bilgilendirme ve bilime katkı yapma sorumluluğu yerine getirilmiş olacaktır. Ayrıca bu maddelerin zararlı etkilerine dikkat çekilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun belirlenmesi ve y¼r¼t¼lmesinde bana her zaman y¼n g¼steren ve destek veren, çalıŐmalarım s¼resince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşe KANICI'ya, danışman hocam olmamasına rağmen her aŐamada yanımda olan bilgi ve tecr¼belerinden yararlandığım, b¼l¼me geldiğim ilk g¼nden beri ilgi ve alakayla hep yanımda olan Prof. Dr. Abdullah DOĞAN'a, ayrıca bu tezin çalışma ve yazılması safhasında desteklerini g¼rd¼Đ¼m Yrd. Doç. Dr. Pınar AKSU ve Yrd. Doç. Dr. Dinçer ERDAĞ'a ve beraber ¼Đrencilik g¼nlerime d¼nd¼Đ¼m b¼l¼m arkadaŐlarım UĞur ERMİŐ ve ¼mer SALTIK'a değerli b¼l¼m hocalarıma ve hayatımın her anında yanımda olan ve beni cesaretlendiren, destekleyen sevgili anneciğim Zarife DEMİR'e, değerlerini hiçbir Őey ile kıyas edemeyeceğim sevgili kız kardeŐlerim Fatma Zehra, Rabia ve AyŐenur'a. Değerli iş arkadaŐım Őervan ARPACI'ya. Artık ahiret yurdunda olan hayatta her Őeyimi borçlu olduğum, hayatımın geri kalan kısmında da her zaman yokluğunu hissedip, ¼zlemle ve minnetle anacağım sevgili babacığım İbrahim DEMİR'e teŐekk¼r¼ bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BEYAN	I
ÖNSÖZ	II
TEŞEKKÜR	IV
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	V
GRAFİKLER LİSTESİ	VIII
RESİMLER LİSTESİ	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
TABLolar LİSTESİ	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
GİRİŞ VE AMAÇ	XVI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Biyositler ve Pestisitler	5
1.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması	8
1.1.3. İnsektisitler	10
1.1.4. Karbamat Grubu İnsektisitler	13
1.1.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	14
1.1.4.2. Kinetik ve Metabolizma	14
1.1.4.2.1. Absorpsiyon	14
1.1.4.2.2. Dağılım	15
1.1.4.2.3. Metabolizma	15
1.1.4.2.4. Atılım	15
1.1.4.3. Çevrede Birikme ve Parçalanma	16
1.1.4.4. Asetil Kolin Ve Asetilkolinesteraz Enzimi	16
1.1.4.5. Asetilkolinesteraz Enziminin Biyolojik Önemi	17
1.1.4.6. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri	19
1.1.4.7. Toksik Etki Mekanizması	20
1.1.4.8. Toksikite Belirtileri	20

1.1.4.9.	Mutajenite	21
1.1.4.10.	Karsinojenite	21
1.1.4.11.	Tedavi	22
1.1.5.	Metomil	23
1.1.6.	İndoksakarb	24
1.1.7.	Mitomisin C	26
1.2.	Genotoksisite	28
1.2.1.	Kromozom Aberasyonları	28
1.2.2.	Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)	30
1.2.3.	Mikronükleus (MN)	32
1.2.3.1	Fare Kemik İliği Mikro Nükleus Yöntemi	33
1.2.3.2.	Sitokinezi Engellenmiş Mikro Nükleus Yöntemi	34
1.2.3.3.	Mikronükleus Hesaplama Kriterleri	35
1.2.4.	Ames Testi	35
1.2.5.	Comet Testi	36
2.	MATERYAL ve METOT	37
2.1.	Materyal	37
2.1.1.	Hayvan Materyali (Deney Hayvanları)	37
2.2	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	37
2.2.1.	Metomil	37
2.2.2.	İndoksakarb	37
2.2.3.	Mitomycin-C (MMC)	38
2.2.4.	Eter (Dietyl Eter, Etoksietan)	38
2.2.5.	Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi	38
2.2.6.	Giemsa	38
2.2.7.	May-Grunwald	39
2.2.8.	Entellan	39
2.2.9.	Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)	39
2.3.	Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları	39
2.3.1.	Hassas Terazi	39
2.3.2.	Santrifüj	39
2.3.3.	Mikroskop	39

2.4.	Metot	40
2.4.1.	Gruplar	40
2.4.2	Mikronükleus Testi	40
2.4.3.	Boyama İşlemi	41
2.4.4.	İstatistik Yöntemi	41
3.	BULGULAR	43
3.1.	Kontrol ve Deney Gruplarına Verilen Bileşiklerin Oluşturdukları MNPCE'ler	43
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	52
5.	KAYNAKLAR	66
6.	ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

°C	:Santigrad derece
ACh	:Asetilkolin
AchE	:Asetilkolinesteraz
ALS	:Alkali Labil Bölgeler
Asetil-Coa	:Asetilkoenzim A
ATP	:Adenozin Trifosfat
BChE	:Butirilkolinesteraaz
BrdU	: 5-bromodeoksiüridin
BN	:Bi nukleus
CA	:Kromozom Aberasyonu
CAT	:Katalaz
CBMN	:Sitokinezis Blok Mikronukleus
ChAT	:Kolinasetiltransferaz
CK	:Kreatin Kinaz
Cyt-B	:Sitokrom B
DDT	:Dikloro Difenil Trikloroethan
Dk	:Dakika
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
DSB	:(DNA) Çift Zincir Kırıkları
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
EPA	:Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Kurumu)
FAO	:Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
G	:Gram
GR	:Glutasyon Redüktaz

GSH	:Glutasyon
GSH-Px	:Glutasyon Peroksidaz
IUPAC	:Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İ.V.	:İntravenöz
KAÜ- HADEK	: Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurulu
Kg	:Kilogram
KKD	:Kardeş kromatid değişimi
L	:Litre
LD₅₀	:Median Lethal Dose
MI	:Mililitre
MMC	Mitomisin-C
Mg	:Miligram
MN	Mikronükleus
MNPCE	:Mikronükleuslu Poli Kromatid Eritrosit
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
NCE	:Normo Kromatid Eritrosit
NPB	: Nükleoplazmik Köprü
O²	:Tekil Oksijen
OK	:Organo klorlu
OF	Organofosfat
ÖD₅₀	:Ortalama Öldürücü Doz
PCE	:Poli Kromatid Eritrosit
PSS	: Periferal Sinir Sistemi
Rpm	:Dakikadaki dönüş hızı
SCE	:Kardeş Kromatid Değişimi

SOD	:Süperoksit Dismutaz
SSB	:(DNA) Tek Zincir Kırıkları
WHO	:World Health Organization
%	:Yüzde

GRAFİKLER LİSTESİ

	Sayfa No
Grafik 3. 1. : 10.000 PCE üzerinden bakılan MNPCE değerleri	47
Grafik 3. 2. : Fare kemik iliğinde saptanan MNPCE oranları	47
Grafik 3. 3. : Toplam MNPCE sayısındaki yüzdeler dağılım	48
Grafik 3. 4. : Gruplar arası mikronükleus sayıları ve standart sapmaları	50

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 3. 1. Yapılan çalışmada pozitif kontrol grubunda görünen bir MNPCE (10x200)	48
Resim 3. 2. Yapılan çalışmada pozitif kontrol grubunda görünen bir MNPCE ve PCE (10x200)	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1. 1.	: Metomil'in kimyasal yapısı	23
Şekil 1. 2.	: İndoksakarb'ın kimyasal yapısı	24
Şekil 1. 3.	: Mitomycin-C'nin kimyasal yapısı	26
Şekil 2. 1.	: Mikronükleus testi yapılışı şematik gösterimi	42

TABLolar LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 1. 1.	: DSÖ tarafından pestisitlerin akut zehirlilik yönünden sınıflandırılması	9
Tablo 3. 1.	: Negatif kontrol grubunda saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdeler oranları	43
Tablo 3. 2.	: Pozitif kontrol grubunda saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdeler oranı	44
Tablo 3. 3.	: Metomil verilen farelerde saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdeler oranı	45
Tablo 3. 4.	: İndoksakarb verilen farelerde saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdeler oranları	46
Tablo 3. 5.	: Gruplardan saptanan toplam PCE ve MNPCE sayıları ve ortalamaları	46
Tablo 3. 6.	: Çalışmada kullanılan maddelerin dozları, verilen süreleri ve MNPCE sayılarının standart dağılımları	49

ÖZET

Bu çalışmada organik karbamatlı insektisitlerden olan metomil ve indoksakarb içeren bazı preparatların farelerde mikronükleus testi ile genotoksik etkileri araştırıldı.

Metomil ve indoksakarb organik karbamatlı insektisitlerdendirler. Tarım alanında pestlere karşı kullanılırlar. Dünya nüfusundaki hızlı artışa bağlı olarak besin ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Bunun yanında kent yaşamının cazibesinden dolayı eski üretim tarzları ve miktarı günümüzde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle günümüzde besin maddelerinin yüksek verimle üretilmesi gerekmektedir. Bunu sağlayabilmek için tarım alanlarına sulama, gübreleme, pestisit uygulamalarının yapılması maalesef kaçınılmaz görünmektedir. İnsanoğlu Hem bitki hem de hayvansal üretiminin artırılması için genetik çalışmalar yapıldığı hatta genetiği değiştirilmiş organizmalar üzerine ciddi çalışmalar yapıldığı bir dönemden geçiyor. Bütün bunlar günümüzde pestisit uygulamalarının önemine dikkat çekmektedir.

Pestisit kullanımda önemli bir nokta ise gereken zamanda ve gerektiği miktarda kullanılmalarıdır. Bu gereklilik verim için ne kadar gerekliyse insan sağlığı ve ekosistemin dengesi için de o kadar önemlidir. Pestisitlerin birikim yaparak zamanla çevrede kalıntılarının görüldüğü ve bu kalıntıların canlılar için oluşturduğu tehlike aşıkardır. Bu tehlike kendini akut, subakut ve kronik zehirlenmeler şeklinde gösterebilir. Zehirlenmelerin yanında genotoksisiteye de neden olarak insan genomunda değişiklikler yapabilecekleri ve bu defektlerin gelecek nesillere aktarılması da söz konusudur. Gen toksisitelerinin bilinmesi çevre ve canlı sağlığının korunması açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada ağırlıkları 20 ± 1 g arasında değişen, 8 haftalık erkek, *Mus musculus* cinsi swiss albino ırkı toplam 40 adet fare kullanıldı. Fareler $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de otoklove edilebilen, polikarbon malzemedden yapılmış kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar kafeslere 10'lu gruplar halinde yerleştirildi. Fareler $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklık, % 50 bağıl neme sahip, sabah 8'den akşam 8'e kadar olan 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyotlu laboratuvar koşullarında barındırıldı. Hayvanlar *ad libitum* olarak standart diyetle beslendi. Uygulanacak maddelerin dozu distile suda çözülerek oral yol ile verildi. Kontrol grubuna (Grup 1) içme suyu olarak distile su verildi.

Pozitif kontrol grubuna (Grup 2) i.p. yolla 2 mg/kg/fare tek dozda Mitomisin C enjekte edildi. Grup 3'e 30 mg/kg kadar metomil içme suyuyla 14 gün süreyle verildi. Grup 4'e ise içme suyuyla 15 mg/kg dozda indoksakarb 14 gün süreyle uygulandı. Hayvanlar 14 gün sonra eter anestezisi altında dislokasyonla ötenazi edildi. Kemik ilikleri çıkarıldı. Boyanarak mikroskopta incelenebilecek preparatlar haline getirildi. Her hayvandan hazırlanan bir preparattan 1000 adet hücre olmak üzere bir gruptan toplam 10 000 adet hücre sayıldı. Hücrelerde polikromatid eritrosit (PCE) ve mikronükleuslu poli kromatid eritrosit (MNPCE) oranları tespit edildi. Araştırma sonucunda MNPCE sayılarının grup ortalaması kontrol grubunda 3,6, grup 2'de 66, grup 3'de 24,9 ve grup 4'de 12,8 olarak tespit edildi. Grup 1, 2 ile Grup 3 ve 4, ayrıca Grup 3 ile Grup 4 arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,001$). Elde edilen sonuçlara göre Metomil ve İndoksakarbın farelerde uygulanan dozlarda genotoksik etkili olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Pestisit, Metomil, İndoksakarb, Genotoksisite, Mikronükleus.

SUMMARY

In this study, which is one of the organic carbamate insecticides methomyl and some preparations containing indoxacarb in the mouse micronucleus test and genotoxic effects were investigated.

Methomyl and indoxacarb put them among the organic carbamate insecticides. Used against pests in agriculture. Depending on the rapid increase in world population food needs are increasing with each passing day. Besides, due to the attraction of city life and the amount of old modes of production are insufficient today. Therefore today nutrients should be produced with high efficiency. To ensure this, agricultural areas, irrigation, fertilization, pesticide application made to seem inevitable, unfortunately. Mankind for both plant and animal genetic studies will be made to increase production even made a serious study on genetically modified organisms, which is going through a period. All this draws attention to the importance of pesticide applications today.

An important point in the use of pesticides and the right amount of time required is used. This requirement, if necessary, how to yield to human health and the ecosystem is so important for balance. By the accumulation of pesticide residues seen around times and the danger posed to live in these ruins is obvious. Acute and subacute and chronic poisoning, this threat may form. Besides poisonings also cause genotoxicity in the human genome will make changes and be passed on to future generations of these defects is also true. Knowledge of gene toxicity in terms of the protection of the environment and vibrant health is very important.

In this study weights ranging from 20 ± 1 g, 8 weeks, male, albino genus *Mus musculus*, a total of 40 mice were used. Mouse 121 C. The autoclave, which can be housed in cages made of polycarbonate material. Animals are housed in a group of 10 cages. Mice, 20 ± 2 ° C temperature, 50% relative humidity, with 8 in the morning until eight in the evening the 12-hour light, 12 hours dark light periods were housed under laboratory conditions. Animals were fed a standard diet ad libitum. The dose of the substance to be applied dissolved in distilled water was given by oral route. Control group (Group 1) was given distilled water as drinking water. Positive control group (Group 2) i.p. 50 µl/10 g mouse ways Mitomycin C was injected in a

single dose (2 mg / kg). Group 3 30 mg / kg dose methomyl, drinking water was given for 14 days. And Group 4 with the drinking water of 15 mg / kg was administered for 14 days indoxacarb. After 14 days the animals were euthanized with dislocation under ether anesthesia. Bone marrow was removed. Staining was made into preparations which can be examined under microscope. Preparations prepared from each animal cells, including a group from the 1000 total of 10 000 cells were counted. PCE and MNPC rates in cells was determined. As a result the number of research groups MNPC average 3.6 in the control group, 66 in group 2, group 3 was found to be 24.9 and 12.8 in group 4. Groups 1, 2 and Groups 3 and 4 may also be differences between Group 3 and 4 were statistically significant ($p < 0.001$). According to the results obtained in mice in doses Methomyl and Indoxacarb genotoxic said to be effective.

Key Words: Pesticide, Methomyl, Indoxacarb, Genotoxicity, Micronucleus.

GİRİŞ VE AMAÇ

Pestisitler doğada tarım alanında kullanılan ilaçlardır. Günümüzde pestisitlerin yaygın olarak kullanılmaları kaçınılmaz bir hal almıştır. Yaygın kullanımına bağlı olarak yanlış kullanılmaları canlı ve cansız çevreye istenmeyecek derecelerde zarar verme potansiyeli taşımaktadır. Gereksiz ve özensiz kullanılmaları insan ve hayvanlarda akut ve kronik tipte zehirlenmelere neden olmaktadır. Bu maddelerle ortaya çıkan zehirlenme etkileri bileşiklerin fiziksel ve kimyasal yapısına göre değişiklik arz eder. Bazı etkilerinin gelecek nesillere aktarılması çok daha büyük önem taşımaktadır. Bu etkilerden biri genotoksitedir. Genotoksik etkiler hücrelerde mutasyon şeklinde seyredebileğinden kanser, teratojenite, alerji ve hücre ölümlerinin ortaya çıkmasıyla sonuçlanabilir. Bazıları kalıtsal hastalıkları doğurabilmesi açısından da dikkate değerdir.

Bu araştırmada veteriner hekimlikte ve tarımda pestisit olarak yaygın kullanılan organik karbamatlı insektisit grubu insektisitlerden Metomil ve İndoksakarb'ın genotoksik etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırmada fare kemik iliği hücrelerinden yararlanılmıştır. *In vivo* olarak planlanan bu çalışmada farelerin kemik iliğinden elde edilen eritrositlerde mikronükleus tespit edilerek genotoksitenin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların halk sağlığı ve çevre sağlığı açısından faydalı olacağı değerlendirilmektedir. Ayrıca ilaçların kullanım amaçları, kullanılması gereken dozları ve kalıntılarının değerlendirilmesine de katkı yapacaktır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Genel Bilgiler

Dünya nüfusundaki hızlı artışa bağlı olarak gıda maddesine olan ihtiyaç da her geçen gün artmaktadır. Klasik bir bilgi olarak dünya nüfusu geometrik olarak artarken, besin üretiminin aritmetik olarak arttığı çoğu bilim adamlarınca ileri sürülmektedir. Artan gıda ihtiyacının karşılanabilmesi için tarım alanlarından elde edilen verimin daha yüksek olması gerekmektedir. Verimi artırmak için tarım alanlarının yaygın olarak gübrelendiği görülmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan gübreler arasında üre, nitrat ve amonyum sülfat esasına dayanan maddelerden yararlanılmaktadır. Bu maddelerin yaygın kullanılması özellikle suda çözünen nitrat ve nitritli maddeler yer altı ve kuyu sularını bariz bir şekilde kirletmektedir. Ayrıca bu maddelerin bitki ve topraktaki düzeylerinin de giderek arttığı görülmektedir. Bu durum toksisite açısından bütün dünya ülkelerinde olumsuz olarak ele alınır. Zararlarını ve birikimlerini azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmakta ve kirliliklere dikkat çekilmektedir. Verim artırmanın diğer önemli bir çalışma alanını da genetik yapıların değiştirilmesi yönündeki girişimler oluşturmaktadır. Elde edilen transgenik ve genetiği modifiye edilmiş ürünlere günümüzde yaygın bir şekilde rastlanılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş organizmalardaki lektin düzeylerin yüksekliği ayrıca ele alınması gereken toksik problemlerdendir (Doğan 2012). Tarımsal alanda sadece verimin artması değil aynı zamanda elde edilen ürünlerin iyi bir şekilde korunması da gerekmektedir. Bu anlamda öncelikle insanoğlu saklanma şartlarının iyileştirilmesine önem vermiş ve bu amaçla çeşitli koruma yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en eskisi soğukta saklama ve soğuk zincirin oluşturulmasıdır ki, halen geçerli olan ve ekolojik açıdan en az zarar veren yöntemlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Fiziksel tedbirlere bağlı korunma yöntemlere ilaveten hastalık ve bozucu etkileri olan zararlılardan yeterince korunma için insekt, rodent, mantar vb biyolojik faktörlere başvurulmaktadır. Fiziksel ve kimyasal tedbirlerle ürünlerin sağlıklı olarak muhafaza edilmesi mümkün gibi görünmektedir. Bu amaç için özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada “pestisit” adı verilen kimyasal tarım ilaçlarının yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Yiğit ve ark. 2008, Doğan 2012).

Tarımsal mücadele; bitkilerin hastalıklardan, zararlı ve yabancı otların olumsuz etkilerinden korunması ve elde edilen ürünlerin miktar ve kalite bakımından daha yüksek olmasını kapsamaktadır. Ayrıca bu amaçla yapılan bütün mücadelenin mümkün olduğunca ekonomik olması istenir. Uygulanan mücadelenin başarılı olması için uygulanan yöntemin entegre savaş (entegre zararlı yönetimi) yöntemlerine uygun olarak yapılması gerekmektedir. Zararlılarla yapılan entegre mücadele yöntemi tarımsal mücadelenin insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olmasına dikkat edilmelidir. Seçilecek yöntem çevreye, uygulayıcı ve ürünlere en az toksik etki yapacak şekilde olmalıdır. Bu nedenle en iyi ve etkili, ayrıca zararı en düşük olan mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Mücadelenin bu çalışmaların dikkate alınarak yapılması büyük önem arz etmektedir (Delen ve ark. 2005).

Pestisitler, besin maddelerinde bulduklarında fiziksel ve kimyasal olarak bozulmaya ve bunun sonucu besin maddelerinin değerinin azalmasına neden olan “pest” adı verilen organizmalara karşı kullanılan ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Pestisitler ilaçlarla yapılan biyolojik mücadelenin bir bölümünü oluştururlar. Pestisitler pestleri öldürerek tarım ürünlerinin bozulmasını engellerler, dolayısıyla ürünlerin dayanma sürelerini uzatırlar. Bu durum aynı zamanda pestisit kullanımının temel amacını oluşturmaktadır (Doğan 2012, Kaya 1998).

Pestlerle yapılan mücadele bilinenin aksine çok eski zamanlara dayanmaktadır. Pestlerin kontrolü amacıyla ilk defa Çinliler kükürdü M.Ö. 1000 yıllarında fumigant olarak kullanmıştır. Aslında bundan çok daha eski zamanlarda savaşlarda kullanılan kimyasal maddeler de bir çeşit biyosit olduklarından pestisitlerin geliştirilmesine düşünce olarak hizmet etmiş olabilirler. Kimya bilimi geliştikçe bu amaçla kullanılan kimyasal maddelerin sayısının da arttığı görülmektedir. Bu maddelerden biri nikotindir. Nikotinin kullanılmasını 17. yy’da tütün yapraklarının sulu ekstresinin sprey şeklinde insektisit olarak uygulanmasıyla başlatmıştır. Bu durum gelişerek günümüzde nikotinoidlerin sentez ve kullanımlarını doğurmuştur. Yine 17. yy’da *Nux vomica* (*Strychnos nux vomica*) tohumları kemirgenlere karşı kullanılmıştır. Halen bu bitkiden elde edilen sitriknin rodentisit olarak kullanılmaktadır. *Derris eliptica* köklerinden elde edilen rotenon ve *Chrysanthemum* çiçeklerinin ekstresinden elde edilen piretrin I, II, Sinnerin I, II insektisit olarak kullanılmış, daha sonra bu maddelerden yaygın olarak kullanılan piretroidler sentezlenmiştir. Bu maddeler bitkisel kaynaklı insektisitler olarak 19.

yy'da kullanıma girmişlerdir (Yurdun 2007). Yine 19.yy'da organik fosforlu, klorlu, karbamat grubu insektisitler geliştirilmiştir. Bu bileşiklerin sayıları günümüzde oldukça fazladır ve insektisit amaçla yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal maddelerdir. (Doğan 2012, Kaya 1998).

Pestisitlerin yaygın kullanılmasının iki ana nedeni vardır. Bunlardan biri dünya nüfusundaki hızlı artış, diğeri de tarım alanlarından ekonomik olarak daha fazla yararlanma isteğidir. Bu nedenle nüfus artışı hızla devam ettiği sürece ve insanoğlu dünyanın kirlenmesine aldırış etmeden daha fazla maddi kazanç sağlamak amacıyla pestisitleri kullanmaya devam edeceği söylenebilir Daha fazla kar elde etme isteği maalesef daha fazla kimyasal madde kullanımını ve sonucunda kirliliği gündeme getirecektir (Doğan 2012). Bu bağlamda pestisitler ele alındığında ekonomik yönden oldukça önem arz eden ilaçlardır. Bu ilaçları üreten firmaların ekonomik bir çıkar elde etmeleri kaçınılmazdır. Diğer bir deyişle pestisit üretimi önemli bir iş sahası haline almıştır. Dolayısıyla bu durumdan üretici firmalar önemli ölçüde ekonomik çıkar elde etmektedirler. Pestisitler tarım ürünlerinin bozunma ve kaybını önleyerek yetiştiriciye ekonomik anlamda bir kar sağlarlar. Bu nedenle pestisitler aynı zamanda ekonomik zehirler grubuna alınmış ve ekonomik toksikoloji içerisinde de incelenmektedir. (Doğan 2012).

Pestisitler biyositlerin bir alt dalı olarak ele alınabilir. Pestisitler oldukça geniş bir ilaç grubunu oluşturur ve kullanım alanlarına göre insektisitler, herbisitler, fungusitler, molusisitler, akarazitler ve rodentisitler vb olmak üzere değişik şekillerde isimlendirilmektedirler. Bu isimlendirme kullandıkları zararlı maddeye göre yapılmaktadır (örneğin, insektlere karşı kullanılıyorsa insektisit, rodentlere karşı kullanılıyorsa rodentisit vb). (Doğan 2012, Kaya 1998).

Pestisitler yalnızca tarımsal üretimde artış ve ürünün korumasına neden olmazlar. Aynı zamanda hem bitki hem de tüketicilerde pestlerle taşınan hastalıkların oranında ciddi anlamda düşme yaparlar. Bitki ve hayvanlarda görülen çok sayıdaki hastalık pestisit uygulamaları ile kontrol altına alınabilmektedir. Bu açıdan ele alındığında pestisitler hem halk sağlığının hem de besinlerin uzun süre korunmasına hizmet ederler. Bu faydalı etkilerinin yanında uygulandıklarında bazı olumsuz etkileri de gündeme gelebilir. Özellikle yanlış doz ve uygulama süresi bariz tanımlanabilen zararlara neden olabilir. Bu nedenle pratikte çeşitli alanlarda kullanılmaları çevre sağlığı açısından büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Uygulanmaları esnasında gereken özen gösterilmediği takdirde toprak, su, hava ve

besin kirlenmesine yol açarak ekolojik dengenin bozulmasına neden olabilmektedirler. Bu nedenle pestisitler uygulanırken özellikle çevrede kalıntı bırakabileceği unutulmamalı ve bunların belli düzeylerinin canlılara zarar verebileceğine dikkat edilmelidir. Bu olumsuzlukları kontrol altına alabilmek için çeşitli kriterlerden yararlanılabilir ki, bunların başında pestisitlerin çeşitli ortamlardaki parçalanma süreleri (parçalanma yarı ömürleri) gelir. Her pestisit çevredeki parçalanma yarı ömrü değişir. Çevre kapsamından burada su, toprak ve hava gibi farklı ortamlar anlaşılmalıdır. Pestisitlerin buldukları bu ortamlarda parçalanma yarı ömürleri farklıdır. Başka bir deyişle bir maddenin toprak ve sudaki parçalanma yarı ömrü ciddi oranda değişiklik arz etmektedir (Kaya ve ark. 1998).

Pestisitlerin tamamı canlılarda ya da çevrede kullanıldıklarında bazı biyolojik yapılar üzerine farklı derecelerde selektif toksisite göstermektedirler. Bu aslında çevrenin korunması açısından değerlendirildiğinde istenen bir özellik olarak kabul edilebilir. Fakat pestisit olarak kullanılan çoğu maddede selektif toksisitesi ya çok düşüktür ya da çevrenin korunması açısından bir anlam ifade etmemektedir. Çünkü uygulandıkları canlıların yanı sıra insan ve diğer memeli hayvanlarda akut ve kronik tipte zehirlenmeler meydana getirebilmektedirler (Vural 2005). Burada zehirlenme açısından kullanılan maddenin çevre şartlarına olan dayanıklılığı ve çözünürlüğü gibi faktörler belirleyici rol oynamaktadır. Özellikle bazı pestisit türlerine uzun süre maruz kalınması durumunda insan ve hayvanlarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik gibi özel toksik etkiler meydana gelebilmektedir. Ayrıca pestisitler insan ve hayvan sağlığı açısından çok önemli olan lipid peroksidasyonuna, kas ve sinirlerde dejenerasyona, çeşitli doku ve organlarda hasar ve tamiri zor bozukluklara neden olabilmektedirler (Kaya ve ark. 1998, Doğan 2012).

Bazı pestisit türleri çeşitli mekanizmalarla hücresel membranlarda lipid peroksidasyonunu tetiklemektedir. Pestisitler ya doğrudan ya da dolaylı olarak bu etkilerini gösterebilir. Bazı pestisit türevleri metabolize edildikten sonra ortaya çıkan serbest radikaller aracılığıyla etkili olurlar ki, bunların bir kısmını reaktif oksijen türleri oluşturmaktadır. Bu radikaller hücre yapıları ile kolaylıkla reaksiyona girerek ciddi hasarların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bazı pestisitler ise etkilerini antioksidanları parçalayarak göstermektedirler. Bazıları da enzimleri inhibe edebilmekte ya da parçalayabilmektedirler (Yarsan ve ark. 1999).

Serbest radikaller biyokimyasal redoks tepkimeleri sonucu ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çok az bir süre için bile olsa çiftlenmemiş bir-iki elektron bulunduran

atom ya da moleküllerdir. Bunlar arasında süperoksit anyon radikali (O_2^{2-}), peroksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH \cdot), singlet (tekil) oksijeni (1O_2) ve nitrik oksit (NO \cdot) gibi radikal türleri sayılabilir. Bu radikaller çok reaktif olup, hücre yapılarıyla kolayca reaksiyona girmektedirler. Metabolizma sonucu ortaya çıkan serbest radikaller öncelikli olarak vücut savunma sistemleri ile ortadan kaldırılırlar. Eğer bu reaktif oksijen türleri vücudun antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılamaz ise hücrelerde yapısal hasarlar ortaya çıkar. Bunun nedenini vücut yapılarını oluşturan başta yağlar olmak üzere diğer yapıların okside olması oluşturur. Özellikle hücre zarında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna bağlı olarak yapısal hasarlar ortaya çıkabilir. Antioksidan savunma sistemi bu hasarları bertaraf etmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Vücut antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler ile glutasyon (GSH), vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan antioksidan etkili maddeleri kapsamaktadır (Kılınç 1985).

1.1.1. Biyositler ve Pestisitler

Biyositler genel anlamda canlı organizmaları öldüren maddeler olarak adlandırılmaktadır. Biyositler bakteri, mantar, alg, bitki, nematot, böcek, rat gibi canlılara karşı insanların lehine olmak üzere kullanılmaktadırlar. Biyositler bu anlam itibariyle geniş bir kavram olup, pestisitleri de kapsamaktadırlar. Pest terimi tarım ürünlerinde fiziksel ve kimyasal bozunmaya neden olan canlıları öldürmek için kullanılan bir kavramdır. Diğer bir deyişle tarım alanlarında kullanılan biyositlere pestisitler denilmektedir (Doğan 2012).

Pestler besin maddelerini hem fiziksel hem de biyokimyasal olarak bozarlar. Dolayısıyla yeni toksik kimyasal ürünlerin ortaya çıkmasına da sebep olabilirler. Örneğin bazı mantar ve bakteriler besin maddelerinde ürediklerinde besinin fiziksel olarak bozunmasına ve ayrıca ortama çeşitli toksinlerin sentezlenerek verilmesine sebep olurlar. Böyle besinlerin tüketilmesinde mikotoksin gibi zehirler ile canlıların temas haline geçmesi söz konusudur. Bu durumda ciddi akut ve kronik zehirlenmelere sıkça rastlanır. Pestler insan ve hayvanların yalnızca besin maddelerini bozmakla kalmaz, aynı zamanda besinlere hastalık etkenlerinin taşınmasına da neden olurlar. Pestler tarım ürünlerine tarlada, taşınma esnasında ya da üretim, işleme, depolama ve tüketim safhasının herhangi birinde bulaşabilirler.

Bulaşma bu safhaların birden fazlasında da olabilir. Bu safhaların hepsi üretimden, tüketime ya da tarladan sofraya kadar gelir. Pestler bu safhaların herhangi birinde ya da birden fazlasında tarım ürünlerini fiziksel ve biyokimyasal anlamda bozarak değerini azaltırlar. Bütün bunları önlemek yani besin maddesinin değerini korumak için pestisitler tarımda yaygın olarak kullanılırlar. Pestisitler besinlerin değerinin azalmasının ya da pestlere bağlı bozunmalarının önlenmesinde kullanılan maddeler olarak da tanımlanabilirler. Bu anlamda tarımda yaygın olarak kullanılan önemli kimyasal maddelerdir ve günümüzde alternatifleri henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Bu nedenle uzunca bir süre pestisit kullanımının devam edeceği öngörülebilir (Doğan 2012)

Pestisitlerin yaygın kullanımının en önemli nedeni artan dünya nüfusunun besine duyduğu ihtiyacın giderek artmasıdır. Bu durumun giderek artacağı da tahmin edilmektedir. Bu ihtiyacın karşılanabilmesi için elde edilen verimin daha yüksek olması ve ürünlerin korunması büyük önem arz etmektedir. Tarım ürünlerinden arzu edilen miktar ve kalitede ürün alınabilmesi, bu ürünlerin hastalık ve zararlılardan yeterince korunmasıyla bu ihtiyacın karşılanması mümkün olabilir. Bu yalnızca bir seçenek olarak ele alınmalıdır (Yiğit ve ark. 2008). Özellikle birim alandan daha fazla verim alma, biyolojik mücadele yapma, sulama, toprağın kalitesini koruma kirlilikleri önleme vb tedbirlerle birlikte yürütülmesi sürdürülebilir bir çevre açısından olumlu olarak düşünülmektedir.

Pestisitler Türkiye ve bütün dünyada yaygın bir şekilde tarım alanlarında zararlılarla mücadelede kullanılırlar. Pestisitlerin bu yaygın kullanımı besin maddelerinde önemli ölçüde kalıntıya sebep olmaktadır. Bu nedenle analizlerde besinler üzerinde pestisitlere sıkça karşılaşılır. Doğrudan toprak, bitki ve hayvanlar üzerine uygulanırlar. Dolayısıyla doğrudan ya da dolaylı olarak çevreye, tarım alanlarına, bitki örtüsüne, insan ve hayvanların vücuduna bulaşabilmektedirler. Pestisitlerin geniş bir uygulama alanları vardır. Su, toprak, bitki, hayvan, depolar, ambarlar pestisitlerinin yaygın kullanıldıkları alanlar arasında sayılabilir. Bütün bunlar özellikle insan ve hayvanlar için çok sayıda etkilenme alanı oluşturur. Bu tür uygulamalarla çevreye, su ve bitki örtüsü ile besinlere yansıyan pestisit kalıntıları buldukları ortamda kısa veya uzun süre kalarak önemli bir çevre kirliliğine sebep olurlar. Ayrıca insan ve hayvanlarda zehirlenme tehlikesine yol açarlar. Pestisitlerin uzun süreli (tekrarlanarak) kullanılması ve bazılarının kalıcı olması ya da parçalanmaya dayanıklı olması, bunların uygulamadan hemen sonra, yani biyosfere

girdikleri andan itibaren besin zincirine dahil olmasına yol açar. Pestisitler canlı ve cansız çevreden canlılara yansıyabilir. Besin zincirinin en üst noktasında bulunan insanlara kadar ulaşırlar. Vücuttaki metabolizma hızlarına ve depolanma özelliklerine göre bir kalış süresi gösterirler. Çevre, hayvan ve insanların vücudundaki miktarları depolanma oranlarına göre giderek artar. Pestisitler besinlerin yanında doğrudan hava ve su aracılığıyla da hayvanlar tarafından alınırlar. Vücutta dışa açık yollar olan solunum, sindirim ve deri yoluyla giren pestisitler insan ve hayvanlarda ölüme kadar gidebilen değişik şiddette zehirlenmelere yol açabilirler. Ayrıca kasıt amacıyla ya da yanlışlıkla yüksek dozlarda hayvanlara verilmesi diğer zehirlenme nedenleri arasında sayılabilir. Yapılan çalışmalarda kasıt ya da suistimal edilen zehirlerin başında pestisitlerin geldiği görülmektedir. Bunun en önemli nedeni bu zehirlerin çevrede kolay bulunabilmesidir. Pestisit zehirlenmeleri akut ve kronik tabiatta olabilir. Akut zehirlenmeler pestisitlerin vücutta bir defada yüksek dozlarda alınması sonucu ortaya çıkar. Bu durum aynı zamanda zehirin etki kuvvetiyle de ilişkilidir. Canlı vücudunda zor yıkımlanan ya da metabolize edilen pestisitler ile vücutta birikme eğilimi gösterenler kronik tipte zehirlenmelere; canlı vücudunda kolay yıkımlanan ve vücuttan çabuk atılan kuvvetli etkililer ise akut tipte zehirlenmelere neden olurlar (Kaya ve ark. 2002). Ancak kolay ve kısa sürede yıkımlanan pestisitlerin sürekli alınması da kronik zehirlenme meydana getirebilir. Özellikle bazı pestisit türlerine uzun süreli maruz kalınması durumunda ya da zehirlerin tekrarlanarak alınması insan ve hayvanlarda mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkiler meydana getirebilir. Başta organik klorlu (OK) pestisitler olmak üzere pestisitlerden bazılarının doza bağlı olarak çeşitli deney hayvanlarının karaciğer ve tiroid bezinde tümör oluşumuna yol açtıkları bildirilmiştir. Ayrıca pestisitler lipit peroksidasyonuna, kas ve sinirlerde dejenerasyona, çeşitli doku ve organlarda hasar ve bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Pestisit kalıntıları uygulandıkları ya da depolandıkları yerlerde başlıca enzimatik ve kimyasal yıkımlanma, buharlaşma ve çeşitli hava olayları ile parçalanır veya kaybolurlar (Kaya ve ark. 1998). Parçalanmaların da diğer faktörlerde rol oynayabilir (fiziksel ve kimyasal faktörler). Parçalanmaları pestisitlerin toksisitesini düşürür. Bu nedenle kalıntıların durumunun değerlendirilmesi ve zehirlenmelerin kontrol altına alınabilmesi pestisitlerin çevredeki parçalanma yarı ömürlerinin tespiti ile gerçek anlamda mümkün olabilir. Parçalanma yarı ömürlerinin belirlenmesi için ciddi araştırmalar yapılmalıdır. Bu durumun forensik açıdan zehirlenmelerin olup

olmadığının değerlendirilmesine de önemli bir katkı yapacağı düşünülmektedir (Doğan 2012).

1.1.2. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, değişik parametreler göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Bunlar arasında etkiledikleri zararlı grubu ile bunların biyolojik dönemi, zararlılara etki yolları, zehirlilik dereceleri ya da kuvveti, içerdikleri aktif madde grubu (zehirin kimyasal yapısı), formülasyon şekilleri ve kullanım teknikleri sayılabilir.

Pestisitler etki ettikleri canlılara göre afisitler, akarisitler, algisitler, arborositler, avisitler, fungusitler, herbisitler, insektisitler, molluskisitler, nematositler, rodentisitler diye sınıflandırılırlar.

Pestisitlerin en fazla sınıflandırma şekillerinden biri kimyasal yapılarına göre olanıdır. Kimyasal yapılarına göre pestisitler organik fosforlu bileşikler, organik klorlu bileşikler, organik karbamatlar, dinitrofenoller, piretroidler, formamidinler, klorlu karbonik asit türevleri, fenoksikarbonik asit türevleri, üre bileşikleri, dipiridinium bileşikleri, nitrobenzoller vb şeklinde sınıflandırılmaktadırlar.

Bir pestisit bir canlı grubunu ya da birden fazla canlı grubunu etkileyebilir. Kaynakları sentetik olabileceği gibi bazıları doğal yollardan da elde edilebilmektedir. Bu nedenle pestisitler kaynaklarına göre de sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırma şekilleri pestisitlerin bir alt grubu olan insektisitler için de geçerlidir. Yani insektisitler kaynaklarına ve kimyasal yapılarına göre öncelikle sınıflandırılmaktadırlar (Doğan 2012).

Pestisitler zehirlilik derecelerine (zehirin kuvveti) göre de sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırılmanın yapılmasında pestisitlerin hedef organizmalar üzerinde toksik etkilerinin yanı sıra hedef olmayan organizmalar ve insanlar üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Çok toksik pestisitler kullanılırken bu durumları daima göz önüne alınmalıdır. Dozlarına daha çok dikkat edilmelidir. Böyle zehirler çevrede uzun süre kalıyorsa canlılar açısından çok daha önemli olmaktadır. Az çok tehlikeli sayılan bu pestisitler mutlaka Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Çevre Koruma Kurulu (EPA) tarafından belirlenen zehirlilik tabloları göz önünde bulundurularak çok titizlikle uygulanmalıdır. Zehirlilik durumu için genel bir kural olarak canlı vücudunda zor metabolize olan ve birikme eğilimi gösteren pestisitler kronik nitelikliken canlı vücudunda hızla yıkılan

ve bunun sonucunda vücuttan çabuk atılan pestisitler ise akut niteliklidir. WHO tarafından kabul edilen ve genellikle sıçanlarda oral veya deri yoluyla ÖD₅₀ miktarlarına göre zehirler Sınıf Ia, Sınıf Ib, Sınıf II, Sınıf III ve zehirsiz-zararsız şeklinde sınıflandırılır (Dökmeci 2001, Doğan 2012)

Tablo 1.1 : DSÖ tarafından pestisitlerin akut zehirlilik yönünden sınıflandırılması (Doğan 2012)

Zehirlilik sınıfı	Sıçan, ÖD ₅₀ , mg/kg			
	Ağız yoluyla		Deri yoluyla	
	Katı	Sıvı	Katı	Sıvı
Sınıf IA	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Sınıf IB	5-50	20-200	10-100	40-400
Sınıf II	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Sınıf III	>500	>2000	>1000	>4000
Normal kullanımda zehirsiz	Katı halde > 2000mg/kg Sıvı halde > 3000mg/kg			

Zehirlerin sınıflandırma şekillerinden en fazla kullanılan grup etki ettikleri canlı türü ve kimyasal yapılarına göre olanlardır. Kullanıldıkları zararlı gruplara ya da hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmaya göre en önemli pestisit grubunu, insektisit, fungusit ve herbisitler oluşturur. İnsektisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları ise organik klorlular, organik fosforlular, karbamatlar, doğal ve sentetik piretroidler şeklinde yapılmaktadır.

Türkiye’de pestisitlerin en önemli kullanım alanını bitkisel tarım oluşturur. Bu alanda kullanılan gruplar arasında % 47 ile insektisitler, % 24 ile herbisitler ve % 16 ile fungusitler yer almaktadır (Erdağı 2012). Dünyada pestisit kullanımında ise % 47’lik dilimle herbisitler ilk sırada yer almaktadır. Bunu % 29 ile insektisitler, % 19

ile fungusitler ve % 5 ile diğ er pestisit grupları takip etmektedir. Bu durum özellikle gelişmiş ülkelerde geçerlidir. Zaten bu grup ilaçlar dünyada en fazla gelişmiş ülkelerde kullanılmaktadır. Kullanım miktarı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Kullanım miktarlarını ülkelerin ekonomik öneme sahip ürünlerinin çeşidi ve bunların üretim miktarları etkiler. Ayrıca, sanayi ve kullanım alışkanlıkları da önemli bir faktördür (Tiryaki ve ark. 2010).

1.1.3. İnektisitler

İnektisitler zararlı böcek türlerine karşı kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar böceklerde metabolizma ve üreme bozukluklarına sebep olurlar. Ayrıca enzim aktiviteleri, davranış şekilleri ve beslenme alışkanlıkları üzerinde değişiklikler oluşturarak etki ederler. Bu durum insektlerin üreme ve yaşam siklusunu bozar, insektlerde metabolik ve fizyolojik ativitelerin bozulmasına neden olur. İnektler bu etkilere maruz kaldıklarında olumsuz etkilenirler ve etkinin şiddeti ile çeşidine bağlı olarak ölürl er. Ölümün ortaya çıkmasında inektisit in uygulanan dozu, uygulama tekrarı ve temas süresi de önemli bir faktör olarak ele alınabilir. İlaçlamalar sonrası gıdalardaki insektlere bağlı bozunmalar ve parazitlenmeler önlenmiş olur. Bu nedenle tarımsal alanda yaygın kullanılan ilaçlardandır lar (Haynes 1988, Doğan 2012).

İnektisitlerin hemen hepsi ya da büyük çoğunluğu nörotoksik etkiye sahiptir. Bu ilaçların büyük çoğunluğu hedef organizmalarda sinir sistemi üzerine toksik etki gösterirler. Böceklerde merkezi sinir sistemi (MSS) çok iyi gelişmiş olup, memelilerinkine benzerlik gösterir. Aynı şekilde periferal sinir sistemi (PSS) de memelilerle benzerlik göstermektedir. Bu nedenle inektisitlerin toksik etki mekanizmaları inekt ve konakçıda benzerdir. Ayrıca ilaçların insektlerde hedef aldıkları organlar bütün böcek türlerinde aynıdır. Ancak inektisitlere karşı hayvanların bireysel ve türsel duyarlılıkları farklılıklar gösterebilir. İnektisitlerin çoğu sinir sisteminde sodyum, potasyum ve klorür iyonlarının membran transportunu engelleyerek (organik klorlular, piretroidler gibi) ya da sinir sisteminde bulunan spesifik enzimleri inhibe edip (örneğin organik karbamatlı inektisitler, asetikolinesteraz inhibitörüdür), sonuçta sinir uçlarından (sinapslarda ya da nöro-effektör kavşaklarda) salgılanan kimyasal nörotransmitterlerin konsantrasyonlarını değiştirerek (organik fosforlular, karbamatlar gibi) nörotoksitelerini gösterirler.

Organik karbamatlı insektisitlerin etki mekanizması asetilkolinesteraz enzimini (AchE) inhibe etmeleri ile açıklanır. Bu nedenle toksik etkilerini sinir ve kas sistemini etkileyerek gösterirler. Organik karbamatlı insektisitlerin toksisitesinin şiddeti asetilkolinesteraz enziminin inhibisyon derecesine bağlıdır. Bu da insektisit bireysel olarak kimyasal ve fiziksel özellikleri ile yakın ilişki içerisindedir. Burada özellikle insektisin molekülünün bireysel çözünürlük özellikleri önemlidir. Çözünürlük insektisitlerin emilme ve etki edecekleri yerlerdeki konsantrasyonunu doğrudan etkilemektedir (Vural 2005). Yağda çözünürlüğün yüksek olması ya da yağlı bir taşıt madde içerisinde çözdürüldükten sonra canlılara uygulanması organik fosforlu insektisitlerin toksisitesinde bariz bir şekilde yükselmeye neden olmaktadır (Doğan 2012).

Günümüzde pestisit kullanımının büyük boyutlara ulaşmasına bağlı olarak çevre ve üzerinde yaşayan canlılar için kaygı uyandıran bir takım sorunlar ortaya çıkmaya başlamış hatta bazı ülkelerde büyük sorunlar ortaya çıkmıştır. Özellikle bilinçsiz ve yüksek oranda çevrede kullanılan pestisitlerden bazıları doğada diğer bir deyişle hava, su, toprakta hem kendileri hem de böyle pestisitlerin parçalanma ürünleri birikmeye başlamış hatta bazı bölgelerde tehlikeli derecelerde birikmiştir. Bu durum hem hedef hem de hedef olmayan bütün canlılar üzerinde olumsuz etkiler oluşturmakta ya da sağlık açısından büyük bir risk taşımaktadır. Pestisit kalıntılarının önemi özellikle 1948 ve 1951 yılları arası organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Çünkü bu kimyasal yapıyı taşıyan pestisitlerin çevredeki dayanıklılıkları oldukça uzundur. Parçalanma yarı ömürlerinin uzun olması organik klorlu insektisitlerin besin zincirine girmesine neden olmaktadır. Kalıntı sorunu bu insektisitlerin dışında diğer pestisitlerde de bulunmaktadır. Pestisitlerin hedef olmayan canlılar ve insanlar üzerinde birikimine yol açan en önemli faktör besinlerdeki kalıntılardır. Bu anlamda insanları bilgilendirme ve birikimin önüne geçmek amacıyla FAO ve WHO Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi kurmuştur ve bilimsel çalışmalarla gıdalarda bulunan pestisit kalıntıları için izin verilen maksimum dozları belirlemişlerdir. Bu düzeyler tolerans düzeyleri olarak da adlandırılır. Ülkemizde bu tolerans limitleri Tarım Bakanlığı tarafından belirlenmektedir. Belirlenme FAO, WHO ve diğer bilimsel kaynaklar göz önüne alınarak çeşitli uzman komisyonlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (Özkaya ve ark. 2013). Bu anlamda Avrupa Birliği ülkelerinde uygulanan ilgili yasalardan da faydalanılmaktadır. Bilimsel kriterler ve uyum ölçütleri çerçevesindeki değerlerde güncellemeler

yapılmaktadır. Bütün bunlar canlıların sağlığını korumaya yönelik yapılan girişimler olarak değerlendirilebilir.

Tolerans d¼zeylerinin titizlikle uygulanması insektisitlerin olumsuz etkilerinden korunmak için yalnız başına yeterli değildir. İnektisitlerin olumsuz etkisinden korunmak için ayrıca bazı tedbirlerin de alınması şarttır. Kullananların ya da uygulayanları önce kendilerini, sonra uyguladıkları canlı ve cansız çevreyi koruyacak tedbirlere başvurması gerekmektedir. Ayrıca besin maddelerini koruyacak girişimlere başvurmalıdırlar. Kullanıcılar uygulama esnasında maske takmalı ve özel elbiseler giymelidirler. Bu durum solunum ve mukozalar-derinin korunması açısından faydalıdır. İnektisitler uygun dozda uygulanmalıdırlar. Uygulamaların yapıldığı bölgelerdeki ürünler belli bir süre geçmeden tüketime sunulmamalı, ilaçlı besin ve suların kullanılmamasına dikkat edilmelidir. İlaç atıkları ve ambalajları rastgele çevreye atılmamalıdır. Ayrıca böyle ilaçların depolanmasına da gereken özen gösterilmelidir. İnektisitler depolardan ve gıda maddelerinden uzak yerlerde bulundurulmalıdırlar. Ağzı kilitli dolaplarda saklanmalıdır. Çocukların ve evcil hayvanların insektisit preparatlarına ulaşmasına izin verilmemelidir (Doğan 2012).

Bilinçsizce kullanılan pestisitlerin doğada birikmelerinin yanı sıra hedef organizmalar üzerinde direnç gelişimi gibi istenmeyen bir duruma da neden olduğu gözlenmiştir. Örneğin 1970 yılında pestisit türlerine dayanıklı sayılabilecek canlı türü sayısı 244 iken bu sayı 1980 yılında nerdeyse iki katına çıkarak 428'e yükselmiştir. Böyle bir durumun en önemli sakıncası bu türlerin ilaçtan etkilenmemesidir. Ayrıca dayanıklı organizmalarla mücadele için daha fazla oranda pestisit kullanımına gereksinim duyulur. Bunun sonucu olarak da ilaç maliyetleri artar ve pestisitlerin ekosistem üzerindeki istenmeyen etkiler ortaya çıkar (Amdur ve ark. 2014). Pestlerin mevcut ilaçlarla ortadan kaldırılamaması yeni ilaç sentezine olan gereksinimi de beraberinde getirmektedir. Bu durum doğal olarak daha fazla iş gücü ve maliyet anlamına gelmektedir.

Zararlı böceklerle mücadelede yaygın olarak 4 temel insektisit grubu kullanılmaktadır. Bunlar organik fosforlu (OF), organik klorlu (OK), organik karbamat ve piretroid sınıfı insektisitlerdir (Ishaaya 2000,Doğan 2012).

1.1.4. Karbamat Grubu İsektisitler

Karbamat grubu insektisitlerler 1950'lerde üretilmiş (fizostigmin dikkate alınarak) ve aynı yıllarda tarımda kullanılmaya başlanmıştır. Sentezlenen karbamat grubu insektisitlerden olan N-metil karbamatlar ekinlerin korunmasında insektisit, akarisit, nematosit ve mollusisit olarak organoklorlu pestisitlerin yerine tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride ve evlerde biyosit olarak da uygulanırlar. Sentetik pestisitlerin büyük bir kısmını oluşturan bu bileşiklerin son 50 yılda oldukça geniş bir ölçekte yeni türevleri geliştirilmiş olup, bunlar günümüzde yaygın olarak üretilerek kullanılmaktadır. Halen tarımda yaygın olarak kullanılan 50'den fazla karbamat grubu insektisit varlığı bilinmektedir (Mickova ve ark. 2005). Özellikle çevrede diğer bazı sentetik insektisitlere göre kolay parçalanmaları ve etki mekanizmaları nedeniyle toksisite açısından daha avantajlı durumda olmaları yaygın kullanılmalarında önemli bir rol oynamaktadır.

Karbamat grubu insektisitler karbamik asitin esterleridirler ve genel formülleri $R_1NH-CO-OR_2$ şeklindedir.

Karbamatlar, karbamik asidin çeşitli N süstitüe esterleri olmaları nedeniyle değişik kimyasal yapıya sahiptirler ve yapılarında farklı kimyasal gruplar taşıyabilirler. Bu anlamda R_1 ve R_2 alkil veya aril grup taşımaktadır. Karbamat grubu herbisitler ise yapılarında R_1 ve R_2 radikali olarak aromatik veya alifatik grup taşırlar

Organik karbamat grubu pestisitler etki ettikleri biyolojik yapı ve kimyasal yapılarına göre 3 değişik sınıfa ayrılırlar.

1. Organik karbamat grubu insektisitler: Bu bileşiklerin yapılarında bulunan R_1 metil grubudur (aldicarb sulfon, aminocarb, metihocarb, propoxur, promecarb, ethiofencarb).

2. Organik karbamat grubu herbisitler: Bu grup ilaçlar yapılarındaki R_1 grubu aromatik bir yapıdır (carbetamid, asulam).

3. Organik karbamat grubu fungusitler: Organik karbamat grubu fungusitlerin kimyasal yapısındaki R_1 benzimidazolden oluşmaktadır (Benomyl, carbendazime).

Bu kimyasal yapıların öğrenilmesi yeni sentezlenecek organik karbamat grubu insektisitlerin etkilerinin hangi yönde ortaya çıkacağına büyük oranda ışık tutabilir. Sonuçta ilaç araştırma geliştirme çalışmalarında hem zaman hem de ekonomik açıdan büyük bir kazanım elde edilir.

1.1.4.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Karbamik asit esterleri yüksek ısıda buharlaşma özelliğine sahip olduklarından çok düşük buhar basıncına sahiptirler. Bu bileşiklerin sudaki çözünürlükleri de azdır. Nonpolar organik çözücülerde az, polar organik çözücülerde yüksek oranda çözünürler. Karbamik asidin N-süstitüe türevleri veya esterleri alkali ortamda genellikle stabil değillerdir, kolaylıkla parçalanırlar. Süstitüe karbamik asidin ester ve tuzları (karbamik asitin türevleri veya bileşikleri) karbamik asitten daha stabildir. İnsektisit aktivitesi olan karbamat türevleri, herbisit aktivitesi olan metil karbamat türevlerine göre alkali koşullarda daha kolay parçalanırlar. Organik karbamat grubu insektisitlerin ısıya dayanıksız olmaları ve polaritelerinden dolayı gaz kromatografisi ile analizleri zordur. Bu yüzden karbamat grubu pestisitlerin analizleri genellikle floresan, UV-VİS, diode-array ve kütle spektrofotometre detektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazları ile yapılır (Mickova ve ark. 2005, Nunes ve ark. 1999). Bu yöntemde düşük ısı uygulanır. Ayrıca polaritenin olumsuz etkisini gidermek için analiz edilecek materyal kolana basınç altında uygun bir çözücü ile verilir.

1.1.4.2. Kinetik ve Metabolizma

1.1.4.2.1. Absorbsiyon

Karbamatların bitki, böcek ve memelilerde emilme, dağılma, metabolizma ve atılma yolları temelde birbirine benzerdir. Organik karbamat grubu bileşikler genellikle deri, mukoza, solunum ve gastrointestinal yollardan kolayca absorbe olurlar. Gastrointestinal yoldan absorpsiyonları % 100'e yakındır (WHO 1986). Solunum yolundan gaz halinde ortamda bulduklarında tama yakın yüksek oranda emilirler. Deriden emilmeleri ise doğal olarak daha düşüktür.

1.1.4.2.2. Dağılım

Farede karbamat grubu ilaçların kandan organ ve dokulara hızlı dağıldığı belirlenmiştir. Kandaki yarı ömürlerinin 8 ile 17 dakika arasında olduğu saptanmıştır. Ayrıca karaciğer, böbrekler, beyin, yağ dokusu ve kas gibi organlarda organik karbamat grubu insektisitlere rastlanır (bu anlamda az da olsa depolanır) (WHO 1986).

1.1.4.2.3. Metabolizma

Organik karbamat grubu bileşikler esterdirler. Bu nedenle karbamatların metabolizmasındaki ilk adımı karbamik aside su ile hidrolizi oluşturur. Karbamik asit daha sonra karbon dioksit, alkol veya fenol ve ilgili amine parçalanır. Organik karbamatların hidrolizi A-esterazlar ve arilesterazlar olarak bilinen bir grup enzim tarafından katalizlenmektedir. Karbamat grubu bileşiklerin metabolizması hidroliz reaksiyonları ile birlikte oksidasyon reaksiyonlarıyla da gerçekleşebilmektedir. Oksidasyonda birçok dokuda var olan karma fonksiyonlu oksidaz enzimleri (monooksijenazlar) katalizör olarak görev üstlenir. Oksidasyon mekanizmaları başlıca aromatik halkanın hidroksilasyonu veya epoksidasyonu, O-dealkilasyon, N-metil hidroksilasyon, N-dealkilasyon, alifatik yan zincirlerin oksidasyonu veya hidroksilasyonu ve tiyoeter oksidasyonudur. Bu şekilde faz bir reaksiyonu sonucu ortaya çıkan ve genelde dokular için aktif olan ara ürünler konjugasyona tabi tutulurlar. Karbamatların konjugasyon reaksiyonları sonucunda O-glukuronid, N-glukuronid, sülfat konjugatları ve merkaptürik asit oluşur (WHO 1986). Genelde oksidasyon ve diğer reaksiyonlar karbamat grubunun hidrolizi sonucu ortaya çıkan bileşiklerde görülür. Bu bileşikler çeşitli yollarla metabolize edilerek inaktif bileşiklere çevrildikten sonra organizmadan dışarı atılırlar.

1.1.4.2.4. Atılım

Karbamatlar suda çözünür metabolitler şeklinde başlıca idrar, safra ve dışkı ile atılırlar. Karbamatların insanda idrar yoluyla eliminasyonu hızlıdır ve insandaki metabolik yollar, sıçanlar ile benzerlik göstermektedir (WHO 1986). Bu nedenle

organik karbamat grubu bileşikler büyük oranda metabolize edilerek vücuttan atılmaktadır.

1.1.4.3. Çevrede Birikme ve Parçalanma

Organik karbamat grubu insektisitlerin çevrede parçalanma yarı ömürlerini ve kalıcılıklarını bazı faktörler etkilemektedir. Kullanılan bileşiğin uçuculuğu, sudaki çözünürlüğü, uygulanan toprağın tipi, toprak nemi, adsorpsiyon özelliği, pH'sı, çevrenin sıcaklığı ve ışık gibi nedenler bu faktörler arasında sayılabilir. Bu faktörler kullanılan pestisitlerin çevredeki parçalanma yarı ömrünü, dolayısıyla topraktaki biyo birikimlerini doğrudan etkiler. Bunların içerisinde en önemlileri toprak tipi ve insektisitlerin sudaki çözünürlüğüdür. Karbamatların toprakta metabolik ayrışmalarının ilk basamağını hidroliz teşkil eder. Bitkiler karbamatları arilhidroksilasyon, konjugasyon veya hidrolitik parçalamayla detoksifiye ederler. Toprakta ve suda bulunan çeşitli mikroorganizmalar organik karbamat grubu insektisitlerin parçalanmasında görev alırlar. Ayrıca bitkiler ve hayvanlar tarafından metabolize edilirler (WHO 1986).

1.1.4.4. Asetil Kolin (ACh) Ve Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)

Sistemik adı asetilkolin asetilhidrolaz [EC.3.1.1.7] olan, daha çok yaygın adıyla asetilkolinesteraz olarak bilinen bu enzim hidrolaz sınıfındadır. Bu enzimin bilinen diğer isimleri de vardır. Bunlardan bazıları da gerçek kolinesteraz, kolinesteraz I ve eritrosit kolinesterazıdır. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE). İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (Torpedo marmorata) elektrik organından ekstraksiyonla elde edilerek saflaştırılmıştır. Bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilmektedir. (Nachmansohn ve Lededer 1939).

Asetilkolinesteraz enziminin günümüzde 7. kromozom tarafından kodlandığı bilinmektedir. Asetilkolinesterazın farmakolojik önemi başta Alzheimer olmak üzere bazı hastalıkların tedavisi için kullanılan bazı ilaçlar ile tarımda kullanılan bazı pestisitlerin hedefinde bulunmasındandır (Doğan 2012). Özellikle organik karbamat ve organik fosforlu insektisitlerin etki mekanizmasının açıklanmasında kullanılmaktadır. Çünkü bu insektisitler AChE inhibe ederek etkilerini ortaya

koymaktadır. Asetilkolinesteraz enzimi ayrıca bazı hastalıkların teşhis edilmesinde de bir anlam ifade etmektedir. Anensefali (kafanın olmaması ya da yarım olması), spina bifida (omur hattının sırtta açık kalması) gibi nöral organ (tüp) defektlerinde (NTD) ve ekzomfalos (karın içi organların karın duvarının dışında kalması) gibi anomalilerde amniyon sıvısında AChE’i belirgin bir artış göstermektedir. Orak hücreli anemide serum AChE düzeyi yükselirken, paroksimal noktürnal hemoglobüride asetilkolinesteraz düzeyi düşmektedir (Özgüven 1994). Bunların tespit edilmesi hastalıkların teşhisinde yararlı olabilmektedir. Ayrıca sinir sistemi bozuklukları ile ilişkili olduğunu da dolaylı olarak ortaya koymaktadır.

Asetilkolinesteraz enzimi organizmada kolinerjik nöronlar, kolinerjik sinapslar, nöromusküler kavşak, eritrositler, akciğer, dalak ve beyinin gri maddesinde bulunmaktadır. AChE’in en önemli substratı asetilkolindir ve bunu büyük bir hızla hidrolize etmektedir. Bunun dışında açıl grupları, asetat ve propiyonattan daha uzun olan kolin esterleri de AChE tarafından substrat olarak kullanılmaktadır (Rosenberry 1975, Harel 1996).

1.1.4.5. Asetilkolinesteraz Enziminin Biyolojik Önemi

Alkaloid olan asetilkolin (ACh), vücutta tanımlanan ilk ve en çok bilinen bir nörotransmitterdir. Kapalı formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ olan asetilkolin, asetik asit ile kolinin esteridir. İlk kez 1914 yılında İngiliz bilim adamı Henry Hallet Dale tarafından tanımlanmış, 1921 yılında ise Avustralyalı bilim adamı Otto Lewi tarafından, kurbağa kalpleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda bir nörotransmitter madde olduğu doğrulanmıştır. Bu keşif bilim adamlarına 1936 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır.

Asetilkolin bugün Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır (Kent 2000). Ayrıca vücuttaki çok sayıda ilacın etki mekanizması ve fizyolojik işlevlerin aydınlatılmasında önem arz etmektedir.

Asetilkolin, kolinerjik sinir uçlarında kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolinin asetil-CoA ile enzimatik asetilasyonu ile sentez edilmektedir. Asetil kaynağını sinir ucundaki mitokondrilerde sentezlenen Asetilkoenzim A oluşturur. Kolin kaynaklarını ise sinir aralığında asetilkolinin yıkılması ve vücutta hücre zarlarında bulunan fosfolipidlerin (fosfatidilkolin) yıkılması ile açığa çıkan kolin, ayrıca diyetle alınan kolin oluşturmaktadır. Kolin sinir ucuna,

sinaps veya kavşak aralığından aktif transportla alınmaktadır. Kolinin asetillenmesi ise hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşmektedir (Kent 2000, Doğan 2012). Sentezlenen asetilkolin presinaptik sinirlerde bulunan veziküller içerisinde kullanım için depolanmaktadır.

Sinir hücrelerindeki aksonlar diğer hücelere sinyal iletiminden sorumludurlar. Sinir gövdesinin ince uzantıları olan dendritler ise komşu sinir hücresinden gelen kimyasal uyarıları almakla görevlidirler. Bu uyarılar sinapslarda kimyasal uyarıya dönüştürülmekte ve sinir hücresinin aksonunda elektriksel uyarıyla ilerlemektedir. Sinir hücresi zarı boyunca kendini gösteren bu elektrokimyasal değişime "aksiyon potansiyeli" adı verilmektedir (Kiss ve Vizi 2001). Oluşan aksiyon potansiyeli dendritten aksona ve oradan akson boyunca ilerleyerek aksonun diğer ucuna geldiğinde, içleri kimyasal iletili maddelerle (asetilkolin gibi bir nörotransmitter) dolu kesecikleri uyarmaktadır. Uyarılmış olan bu kesecikler, ekzositoz yoluyla içerdikleri iletili maddeleri sinapsa salgılamaktadırlar (Noyan 1988). Böylece elektriksel uyarı sinapslarda nörotransmitter maddeler yardımıyla kimyasal bir uyarı haline dönüştürülmektedir. Bu kimyasal uyarı da bir sonraki sinir hücresinde yeni bir aksiyon potansiyeli başlatmaktadır (Noyan 1993, Bayrak 2008). Burada transmitter maddelerin alıcı sinir membranında bulunan reseptörler devreye girmektedir. Akson ucundan bu şekilde salınan sinirsel iletiliciler, iki sinir hücresinin arasındaki sinaptik aralığa geçmektedir (Bunin ve Wightman 1999). Sinaptik aralığı oluşturan sinir uçlarından sinirsel uyarıyı aktaran uca "sinaps öncesi (presinaptik) uç", sinirsel uyarıyı alan uca ise "sinaps sonrası (postsinaptik) uç" adı verilmektedir (Bunin ve Wightman 1999). Elektriksel uyarı akson ucuna vardığında, sinaps öncesi uçtan salınan sinirsel iletiliciler, sinaps sonrası uçta bulunan reseptörleri uyarmaktadırlar. Reseptörler, hücrelerde dış (ör. ilaçlar) ya da iç kaynaklı kimyasal madde moleküllerini seçici bir şekilde bağlayan, etkinin başlamasına aracılık eden protein yapıdaki özel maddelerdir (Bear ve ark. 2006). Uyarılmış olan reseptör, kendisine bağlı olarak çalışan çeşitli enzim sistemlerini etkinleştirerek veya baskılayarak ya da hücre yüzeyinde bulunan iyon kanallarını açıp kapatarak hücrede aksiyon potansiyeli oluşmasını sağlamaktadır. Ancak unutulmaması gereken her transmitter maddenin aksiyon potansiyelini aktarmada rol oynayamadığıdır. Bazı transmitter maddeler aksiyon potansiyeli oluşumunu engellerler yani inhibitör özelliktedirler. Bu şekilde bazı uyarılar alıcı sinirlere aktarılmaz. Uyarıyı aktaran transmitter maddelere eksitator, bloke eden transmitter maddelere ise inhibitör

transmitter maddeler adı verilir. Asetil kolin eksitator etkili bir transmitter maddedir. Uyarma işlemi tamamlandıktan sonra, süreçte rol oynayan nörotransmitterler (asetilkolin), ya sinaptik aralıkta bulunan enzimlerce parçalanarak inaktif hale dönüştürülmekte ya da presinaptik uca geri alınarak etkisiz kılınmaktadır (Bear ve ark. 2006, Bayrak 2008).

Bir nörotransmitter madde olan asetilkolinin görevi, presinaptik sinir hücreleri tarafından sinaptik aralığa salındıktan sonra sinirsel uyarıları postsinaptik uca aktarmaktır. Bu şekilde sinir sistemi boyunca ileti sinirlere ya da kas gibi ilgili dokulara ulaşmış olur (Geula ve Mesulam 1999). Kolinerjik ileti sinaptik aralıktaki asetilkolinin asetilkolinesteraz enzimi tarafından hızla (30 milisaniye içerisinde) katalitik hidroliz yolu ile sonlandırılır. Bu durum gelecek yeni bir iletinin devamı için şarttır (Swartz 2000). Aksi halde yeni iletiye sinapslar cevap veremez.

Asetilkolinin hidrolizi sonucu sinaptik aralıkta oluşan kolin, presinaptik nörona alınarak tekrar ACh sentezinde kullanılmaktadır. Kolinesterazların ortamda bulunmaması hem ACh sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki ACh etkisinin uzamasına yol açmaktadır (Silver 1974). Bazı asetilkolinesteraz inhibitörleri ise pestisit olarak kullanılmasının yanında öldürücü asetilkolinerjik uyarım yaratmak üzere kimyasal sinir gazlarının (organik fosfat temelli, sarin, soman, tabın vb.) üretiminde de kullanılmaktadır (Silver 1974, Mesulam ve ark. 2002, Doğan 2012).

1.1.4.6. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlara asetilkolinesteraz inhibitörleri veya antikolinesterazlar denilmektedir. Asetilkolinesteraz inhibitörleri asetilkolinesterazın yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedirler. Santral ve periferik kolinerjik etkinin güçlenmesi kullanılan ilaçların farmakokinetiği ile ilgilidir. Örneğin fizostigmin beyine geçerek santral etkilere sebep olurken, neostigmin beyine geçememekte ve yalnızca periferik etkilere neden olmaktadır. Antikolinesterazların sınıflandırılması en fazla reversibl ve irreversibl etkileri göz önüne alınarak yapılmaktadır. II. Dünya Savaşı'ndan önce sadece reversibl kolinesteraz inhibitörleri (fizostigmin) bilinirken savaş sırasında uzun süre etkili ve oldukça toksik bileşikler olan irreversibl bileşikler (organik fosforlu insektisitler) geliştirilmiştir. Kolinesteraz inhibitörleri klinik olarak, başta

alzheimer olmak üzere myastenia gravis gibi asetilkolin yetmezliği ile paralel giden hastalıklarda sinaptik aralıktaki ACh'i artırmak üzere tedavi amaçlı kullanılır (neostigmin vb). Glokomda da kullanımı vardır (Alaşehirli 2005, Yaren ve ark. 2007, Doğan 2012).

Asetilkolin esteraz enziminin anyonik özelliğe sahip bölgesini tutan ajanlar reversibl, esteratik özelliğe sahip bölgesini uzun süre tutanlar ise irreversibl inhibisyona neden olmaktadır (Quinn 1987). Aslında birleşme asetilkolinde her iki noktaya da olmaktadır. Ancak organik fosforlu insektisitler kovalent bağla esteratik bölgeye bağlanarak uzun süre orada kalırlar ve bu da onların etkilerinin dönüşümsüz olmasına neden olur. Karbamat grubu insektisitler ise anyonik bölgeye affinite duyar yani iyonik olarak bağlanır ve kısa sürede bu noktadan ayrılır. Bu nedenle karbamat grubu insektisitlerin etkileri reversibldir.

1.1.4.7. Toksik Etki Mekanizması

Karbamatlar sinir sisteminde asetilkolinesteraz enzimini reversibl olarak inhibe ederler. Asetilkolinesteraz enziminin esteratik bölgesinin karbamilasyonu sonucu inhibisyon görülür. Karbamat-enzim kompleksi kısa sürede kendiliğinden ayrılmaktadır. Asetilkolinesteraz rejenerasyonu fosforlanmış enzime kıyasla hızlıdır. Dolayısıyla organofosforlu pestisitlere oranla hem insanlar hem de diğer memeliler için daha az toksiktirler. Karbamat grubu pestisitlerin ölüme sebep olan dozları ile minimum zehirlenme belirtileri oluşturan dozları arasındaki oran, organofosforlu bileşiklere göre geniştir (toksik güven faktörü). Ayrıca kimyasal yapılarından dolayı karbamatlar gecikmiş nöropatiye neden olmazlar. Bu durum karbamat grubu insektisilerin önemli avantajlarından (WHO 1986, Barile 2004).

1.1.4.8. Toksikite Belirtileri

Substrat-enzim kompleksi reversibl olduğundan karbamatların toksisitesi organofosfatlara göre daha kısa sürede sonlanır ve daha düşük şiddette görülür. Karbamatlar hızlı metabolize edildiğinden ve metabolitleri de çabuk elimine edildiğinden ortaya çıkardıkları zehirlenme belirtileri saatler içinde kaybolur. Eritrositler ve plazmadaki kolinesteraz aktivitesi tekrar kısa sürede normale döner. Bu yüzden karbamat grubu insektisitlerin hem nikotinic hem de muskarinic

bölgelerdeki etkileri sınırlı ve zayıf olarak ortaya çıkar. Kolinerjik aktivasyon kısa sürelidir. Karbamatların kan-beyin bariyerine penetrasyonları zayıf olduğundan dolayı santral sinir sistemi toksisiteleri de düşüktür (Barile 2004, WHO 1986). Neostigmin gibi ilaçlar santral sinir sistemine geçememektedir.

Organik karbamat grubu insektisitlerin etkileri fosforlu insektisitlerin etkilerine benzer. Ancak onlardan daha hafif ve daha kısa süreli olarak görülür. Etkileri genel maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

-Muskarinik etkiler: Bronşiyal salgılarda artma, bronkokonstrüksiyon, terleme, salivasyon, lakrimasyon, miyozis, bradikardi, kan basıncında düşme ve abdominal kramplardır.

-Nikotik etkiler: Taşikardi ve kaslarda ortaya çıkar.

-Santral sinir sistemine etkileri: Baş dönmesi, baş ağrısı, anksiyete, mental konfüzyon, konvülziyon, solunum depresyonu ve koma şeklinde sıralanabilir.

Bunların dışında bazı karbamatlar deri ve göz iritasyonu, hiperpigmentasyon ve sperm anomalisine de neden olabilirler (WHO 1986, Yurdun 2007, Barile 2004).

1.1.4.9. Mutajenite

Genel olarak N-metil karbamatlar memelilerde yapılan bazı testlerinde mutajenik yönden negatif bulunmuştur. Ancak karbendazim, benzomyl ve 2-thiofanat gibi karbamat türevi bileşiklerin yüksek dozlarda bazı test sistemlerinde pozitif mutajenik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bunların dışında benzimidazol grubu maddelerin DNA bazlarına ve iğ ipliğine toksik etkilerinin olabileceği bildirilmektedir. Bunlar antimitotik ajanlardır. Bu nedenle mitozu durdurma, mitotik gecikmeye neden olma ve düşük oranda kromozomal hasar oluşturma gibi etkileri söz konusudur. Araştırmalarla elde edilen bazı sonuçlar çelişkilidir ve tekrar edilememiştir. Fakat nokta mutasyonu ve kromozom aberasyonu ile elde edilen pozitif sonuçlar yeterince açıklanmıştır. Sonuç olarak benzimidazol türevleri ve bazı karbamatlar zayıf mutajenik bileşikler olarak kabul edilebilirler (WHO 1986).

1.1.4.10. Karsinojenite

Etil karbamatlar (örneğin üretan) kimyasal yapısı nedeniyle iyi bilinen bir karsinojendir. Molekülde görülen herhangi bir değişiklik özellikle etil gruplarının

daha büyük yan zincirlerle yer değiştirmesi sonucu üreanın karsinojenik potansiyeli azalmaktadır. Ayrıca nitrojene bağlı alkil grupları da benzer etkiye neden olur. Bununla birlikte farklı karbamatlarla uzun dönem karsinojenik etki çalışmalarında karsinojen olup olmadıkları konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır (WHO 1986).

Karbamat grubu pestisitler metabolizma sonucu N–nitrozo bileşiklerine dönüşebilirler. N-nitrozo bileşikleri mutajenik ve karsinojenik olarak kabul edilirler. Bununla birlikte karbamat grubu pestisit kalıntılarının besinlerle alınması ile ortaya çıkan nitrozo bileşiklerinin miktarı oldukça düşüktür. Doğal olarak besin ve içme suyu ile alınan nitrozo-prekürsorlerinin yanında ihmal edilebilir düzeydedir (WHO 1986). Ancak yine de karsinojenik etkileri nedeniyle daima dikkate alınmalıdır. Çünkü karsinojenik maddelerin tolerans düzeyi sıfır olarak kabul edilmektedir.

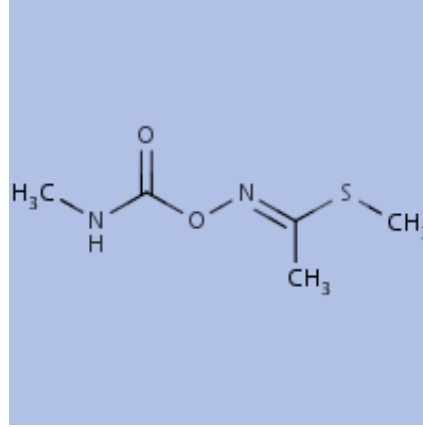
1.1.4.11. Tedavi

Karbamat grubu bileşiklerle meydana gelen zehirlerin tedavisi semptomatik olarak yapılmaktadır. Dekontaminasyon yapılır. Hava yolu açık tutulur ve solunum sistemi stimüle edilir. Ağız yoluyla aktif kömür verilerek sindirim kanalından alınan bu bileşiklerin adsorbe edilmesi sağlanarak emilmeleri geciktirilir. Bunlar başvurulacak ilk destekleyici tedavilerdir.

Dermal maruziyet oluştuğunda pestisit bulaşmış kıyafetler çıkarılır ve deri sabunla yıkanır. Göze maruziyet olduğunda gözler bol suyla ve % 3'lük sodyum bikarbonat çözeltisi ile bolca yıkanır. Ağız yoluyla alınmışsa kusabilen hayvanlar kusturulur (kedi, köpek ve küçük ruminantlar). Kusturmanın başarılı olabilmesi için ayrıca şuurun da yerinde olması gerekir. Eğer hastanın bilinci açıksa 10-30 ml ipeka şurubu, ardından 200 ml su uygulanır. Eğer hayvan kusamayacak özellikte ise ve bilinci yerinde değilse o zaman kusturmanın yerine midenin yıkanması önerilir. Bileşiği uzaklaştırmak için gastrik lavaj veya müshil uygulaması yapılabilir (sürgüt uygulanması kusamayan ve şuuru olmayan hayvanlara uygulanabilir). Solunum bozukluğu görüldüğü takdirde trakeal tüp ile yapay solunum uygulanmalıdır. Solunum düzelinceye kadar bu işleme devam edilmelidir. Solunum uyarıcıları ile bronkodilatörlerden ihtiyaç halinde yararlanılır. Gerekliyorsa zehirlenenlere sıvı takviyesi yapılmalıdır (Barile 2004).

Organik karbamat grubu insektisitlerin spesifik antidotu atropindir. Antidot olarak kullanılan atropin, asetilkolinin etkilerini reseptör düzeyinde kompetitif olarak bloke eder. Dolayısıyla sinapslarda yükselmiş olan asetilkolinin kolinerjik etkilerini (zehirlenme belirtilerini) ortadan kaldırır. Atropin ağız ve bronşiyal salgılama kuruyuncaya kadar verilmelidir. Çocuklarda 0.02 mg/kg dozda i.v. yolla 5-10 dak. bir, erişkinlerde 1-5 mg/kg dozda i.v. yolla 5-10 dak. bir tekrarlanabilir. Hayvanlardaki dozu 2 mg/50 kg'dır. Klinik belirtiler kayboluncaya kadar doz tekrar edilebilir. Karbamoillenmiş kompleksde 'enzim eskimesi' görülmediğinden 2-PAM kullanılmamaktadır. Eğer kullanılırsa toksisiteyi artırma riski doğar. Ancak eğer karbamat ve organofosfat zehirlenmeleri birbirinden kesin olarak ayırt edilemiyorsa 2-PAM uygulaması yapılabilir (ilk 4-6 saat içerisinde, mümkünse daha erken yapılmalıdır). Organik fosforlu insektisitlerde zaman geçtikçe enzim eskimesi ortaya çıkacağından oksim preparatlarının uygulanmasının da bir önemi kalmamaktadır. Anksiyete ve atropinin etki göstermediği merkezi sinir sistemi kaynaklı belirtilere karşı diazepam kullanılmaktadır. Bu amaçla diazepam 10 mg subkutan (s.c). veya i.v. dozu yeterlidir ve gerekirse uygulama tekrar edilebilir (Barile 2004).

1.1.5. Metomil



Şekil 1.1: Metomil'in kimyasal yapısı

(<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+16752-77-5>)

Bu çalışmada kullanılan organik karbamat grubu insektisitlerden olan metomilin kapalı formülü C₅H₁₀N₂O₂S yukarıda verilmiştir.

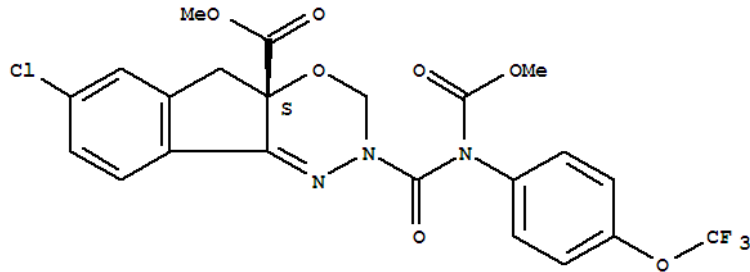
Metomilin Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi (E, Z)-metil N-[[[(metilamino) karbonil] oksimino]etanimidothioate.'dır.Çevre koruma kurumu (EPA) sınıfı 1 dir (Pastor ve ark. 2001).

Metomil kolinesteraz enziminin bir inhibitörüdür. Sistemik insektisit ve akarisit özelliğindeki bu pestisit aynı zamanda kontak ve mide zehri etkisi de vardır. Özellikle Lepidoptera, Hemiptera, Homoptera, Diptera ve Coleoptera takımlarından çok sayıda böcek ve kırmızı örümcek türüne karşı meyve, bağ, zeytin, sebze, süs bitkisi ile keten, pamuk, soya fasulyesi gibi çok sayıda kültür bitkisinde kimyasal savaş maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten aynı zamanda kümes ve ahırlarda sinek kontrolünde kullanıldığı da bilinmektedir (Tomlin 2006). Bu şekilde hayvanlar dış parazitler etkenlerden uzaklaştırılmış olur. Dolayısıyla parazitlerin doğrudan etkilerinin yanında taşıdıkları hastalık etkenleri ile verdikleri zararlar azaltılır. Verim ve karlılık artar. Daha sağlıklı canlılar elde edilir.

Metomilin akut oral LD50 değeri sıçanlarda 30 mg/kg olup, zehirlilik sınıfı I'dir. MRL (Maksimum kalıntı limit) değeri hıyarda 0.05, biberde 0,2 ppm, bekleme süresi hıyarda 3 gündür (Tomlin 2006).

Metomil arılarda orta derecede zehirli (LD50: 0.16 µg/ arı), balıklarda orta derecede zehirli (LC50: 0.63 mg/l), kuşlarda çok zehirli (LD50: 24,2 mg/kg), solucanlara ise orta derecede zehirli (LD50: 19 mg/kg)'dir. Topraktaki yarılanma ömrü oldukça kısa olup (DT50: 4–8 gün) kalıcı insektisit olmayan grubundadır (Öncüler ve ark. 2008).

1.1.6.İndoksakarb



Şekil 1.2: İndoksakarbın kimyasal yapısı

(<http://www.lookchem.com/Indoxacarb/>)

İndoksikarbın kapalı formülü C₂₂H₁₇ClF₃N₃O₇'dir. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi metil 7-kloro-2,5-dihidro-2-[[[methoksikarbonil] [4-(trifloromethoksi) fenil] amino] karbonil] indeno [1,2 e] [1,3,4] oksadiazin-4a(3H)-karboksilate'dır (EPA sınıfı 2'dir). (U.S. EPA 1982).

İndoksakarb karbamat grubu bir insektisit olup, etki mekanizması onlardan biraz farklıdır. Sinir sistemindeki sodyum kanallarını bloke ederek sodyum iyonlarının girişini engellenmesine neden olur. Böceğin felç olması, beslenmesinin durması ve sonunda ölüme dayalı bir etki mekanizmasına sahiptir. İndoksakarb vücuda alındıktan sonra 0-4 saat içerisinde böcekte beslenme durur. Sonra 4-48 saat içerisinde gelişen felci ölüm izler (Lee ve ark. 2005).

Tarımda Lobesia botrana'ya karşı ruhsatlı olup yoğun olarak bağlarda kullanılmakta olan indoksakarb, bağdan başka antepfıstığı, biber, domates, fındık, incir, kiraz, pamuk, patates, sebze, şeftali, turunçgiller ve zeytinde değişik zararlıları kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır (Yücer 2012).

İndoksakarb'ın insektisit aktivitesi oldukça stereospesifik olsa da R enantiyomeri insektisit olarak aktif değildir. Böceklerde proinsektisit olarak rol oynayan indoksakarb, DCJW ile gösterilen ve çok daha kuvvetli N-dekarbometoksillenmiş metabolitine dönüşümü için esteraz ya da amidaz' a ihtiyaç duymaktadır. Yani metabolizma sonucu aktif olmaktadır.

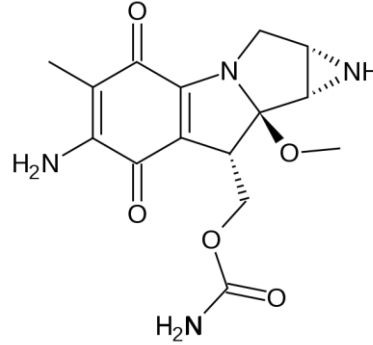
Lepideptora böcekleri indoksakarb'ı DCJW' ye dönüştürmekte oldukça başarılıdırlar. Bu yüzden ilaç oldukça etkilidir. İndoksakarb'ın DCJW' ye bu metabolik dönüşümü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisi yardımıyla larvalar üzerindeki nörotoksik belirtilerle eş zamanlı olarak belirlenmiştir. Lepideptora larvalarının çeşitli türleri de indoksakarb'ı insektisit etkiye sebep olan aktif bileşik dekarbometoksillenmiş türevi olan DCJW'ye metabolize edebilmektedir. Memelilerde DCJW'nin etkisi için literatürde kullanılabilir bir bilgiye rastlanamamıştır. Çeşitli çalışmalar DCJW'nin sodyum kanallarını bloklamada indoksakarb'dan daha etkili olduğunu göstermiştir (Kristopher ve ark. 2005).

İndoksakarb'ın 25 °C' de pH 5'te DT₅₀ 500 gün, pH 7'de DT₅₀ 22 gün, pH 9'da ise DT₅₀'si 0,3 gün olarak belirlenmiştir. (<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/indoxacarb.pdf> Erişim Tarihi: 14 Mayıs 2014). Erkek sıçanlarda akut oral LD₅₀'si 1730 mg/kg, dişi sıçanlarda akut

oral LD₅₀'si 268 mg/kg, sıçanlarda akut dermal LD₅₀'si >5000 mg/kg'dır. Sıçanlarda akut solunum yoluyla alınabilecek doza maruz kalma süresi 4 saat kadardır. (<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/indoxacarb.pdf> Erişim Tarihi 14 Mayıs 2014). Burada geçen LD₅₀ solunum yolu dışında diğer bir yol ile organizmaya girerek etki gösteren katı veya sıvı haldeki kimyasal maddenin belli koşullarda bir defada verildiğinde, verildiği gruptaki hayvanların %50'sini öldüren dozdur. LC₅₀ ise solunum yolu ile organizmaya girerek etki gösteren gaz halindeki kimyasal bileşiklerin akut toksisite ölçüsüdür. Belirli koşullarda solunum yolu ile bir gruptaki hayvanların %50'sini öldüren kimyasal maddenin solunan havadaki konsantrasyonudur.

İndoksakarb organofosfatlar karbamatlar ve pretreoidler karşı direnç kazanmış böcekler için kullanılan ilk ticari yeni tip karbamat grubu bir insektisittir. Çevre için güvenli, hedefte olmayan organizmalar için düşük zehirli, böcekler için yüksek derecede öldürücü özellikleri vardır. İndoksakarb'ın keşfi büyük çabalar sonunda olmuştur (DuPont 1999).

1.1.7. Mitomisin C (MMC)



Şekil 1.3 :Mitomisin C'nin kimyasal yapısı (Mao ve ark. 1999)

Mitomisin C'nin moleküler formülü C₁₅H₁₈N₄O₅'dir. Kimyasal olarak Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) ismi [6-Amino-8a-metoksi-5-metil-4,7-diokso-1,1a,2,4,7,8,8a,8b oktahidroazireno [2',3':3,4] pirolo [1,2-a]indol-8-il] metil karbamat'dır. Sistematik olarak ise {11-Amino-7-metoksi-12-metil-10,13-diokso2,5diazatetrasiklo[7.4.0.0.0]trideca-1(9),11-dien-8-il} metilkarbamat olarak

adlandırılır. Mitomisin C'nin molekül ağırlığı 334.33 g mol⁻¹ dür. Görünümü mavi lacivert kristaller halindedir. Mitomisin C 360 °C'nin üzerinde erir. Suda çözünürlüğü 8.43 g L⁻¹ ve izoelektrik noktası 10.9'dur. Suda, metanolde, asetonda kolay çözünür ama benzen, karbontetraklorürde ve eterde zor çözünür (Dal 2002).

Mitomisin C 1950 yıllarında *Sterptomyces caespitosus* veya *Streptomyces lavendulae*'den elde edilen aziridin kimyasal yapısını içeren doğal ürünler ailesine aittir. Antitümöral etkili bir antibiyotiktir. Mitomisin C çok etkili bir DNA çapraz bağlayıcısıdır (Çırak 2008). Dolayısıyla hücrelerin çoğalmasını engellemektedir.

Mitomisin C tümör hücrelerindeki DNA'ya bağlanır ve DNA çift sarmalının iki kolu arasında çapraz bağlar oluşturur. Böylelikle DNA'nın replikasyonunu önleyerek antitümöral etki gösterdiği düşünülmektedir. Mitomisin C'ye duyarlılığın DNA'nın geç G1 fazından DNA sentezinin erken S fazı boyunca yüksek olduğu ispatlanmıştır.

Mitomisin C'nin farmakokinetik özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. İntravenöz olarak enjekte edildiğinde kanda 17 dakika sonra kaybolur.
2. Büyük oranda parçalanır ve kan-beyin bariyerini aşamaz.
3. Karaciğerde metabolize edilir.
4. Vücuttan metabolitleri idrarla atılır. Düşük miktarlarda feces ve safradan da atılır.

Mitomisin C çok geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Alkilleyici ajan gibi davranarak DNA çapraz bağlarını kırmak yolu ile etkili olur. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda protein ve RNA sentezini inhibe ederek antineoplastik etkisini göstermektedir (Arbag ve ark. 2005).

Genitoüriner sistemin transisyonel tümörleri ve yaygın adenokarsinomların tedavisi için geleneksel olarak kullanılan sistemik bir kemoterapotik ilaçtır (Fattah ve ark 2003). Ayrıca mitomisin c göz cerrahisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Otolaringolojik yaklaşımlarda nazolakrimal kanal tıkanıklığının engellenmesi, üst solunum yolu darlığının engellenmesi, dış kulak yolunda skar gelişiminin önlenmesi ve laringotrakeal rekonstriksiyon için mitomisin c kullanıldığı rapor edilmiştir (Talmi ve ark. 2005). Yüksek dozda uygulanan mitomisin C'nin orta kulakta toksik etkisi sonucu yoğun ototoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Jassir ve ark. 2001).

1.2. Genotoksisite

Canlıların kendine has genetik bilgilerini taşıyan gen rekombinasyonunda çeşitli sebeplerle ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerine mutasyon adı verilir. Mutasyonlar doğada kendiliğinden oluşabileceği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana getirilebilirler. Mutajenler DNA molekülünde bir ya da birden çok hasar oluşturabilirler. Bu hasarların bir kısmı hücre düzeyinde özel mekanizmalar ile onarılmaya çalışılır. Bazen DNA'da meydana gelen hasarlar hücrenin ölümden kurtarılabilmesi için mecburen yanlış olarak da onarılabilir. Bazen de bu onarım mekanizmalarının çalışmasını kontrol eden genlerdeki mutasyon sonucu veya yaş, hastalıklar, beslenme, ısı gibi şartların olumsuz etkisiyle DNA'da meydana gelen bu hasarlar onarılmadan kalabilir. Bunun sonucu olarak o hücrenin genlerindeki mutasyon artık kalıcı hale gelebilir. Bu mutasyon gelecek nesillere aktarılabilir. Mutasyon sonucu yeni nesillerde çeşitli anomaliler ortaya çıkar. Kanser ve hücre ölümü bunlar arasında sayılabilir. Mutasyonlar bazen de canlıda üstün bir karakterin ortaya çıkmasına da neden olabilir. Genellikle mutajenler ile ortaya çıkan mutasyonlar canlılar için olumsuz olan özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Galloway ark. 1998, İpek ve ark. 2003).

DNA'da oluşan mutasyonların belirlenmesinde bazı testler kullanılır. Bunlar; Ames Testi, İn Vivo Memeli Fare Kemik İliği Kromozom Aberasyon Testi, İn Vivo Memeli Eritrosit Mikronukleus Testi, İn Vitro Memeli Hücre Gen Mutasyon Testi, bakteri kullanarak yapılan geri mutasyon testleri ile belirlenebilir. DNA'da oluşan hasarın ve genotoksik etkilerin sitogenetik açıdan araştırılmasında bu saydığımız yöntemler içerisinde en fazla kullanılanlar in vitro memeli kromozom aberasyon, kardeş kromatid değişimi, ames testi, comet testi ve mikronukleus testidir (Natarajan ve ark. 1982).

1.2.1. Kromozom Aberasyonları

Kromozomların yapı ve sayısındaki değişimlere kromozom aberasyonları (KA=CA) denir. Bu değişiklikler sonunda genlerin yerleşim düzenleri ve sayıları değişir. Bu değişimlerin sonucu olarak da farklı genotipik özellikler ortaya çıkar. Bu

da doğal olarak canlıların fenotipine yansır. Kromatid kırığı, fragment, kromozom kırığı, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, inversiyon, translokasyon izokromozomlar yapısal kromozom aberasyonlarıdır. Yapısal kromozom aberasyonları, aberasyonun kromozomun bir veya iki kromatidinde görülmesine bağlı olarak ikiye ayrılır. Eğer aberasyon tek bir kromatidde görülüyorsa buna kromatid tipi aberasyon, her iki kromatidinde görülüyorsa bu olaya da kromozom tipi aberasyon denir. Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve mutajenin çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Natarajan ve ark. 1982).

Homolog olmayan kromozomlar arasında meydana gelen karşılıklı parça değişimine ise translokasyon denilir. Farklı kromozomlar arasında simetrik parça değişiminde, sonraki mitozda görülebilir bir değişiklik meydana gelmez iken, asimetrik parça değişiminde, bir sonraki mitozda bir disentrik kromozom ve iki asentrik fragment görülür. İzokromatid delesyonlar, bir kromozomun iki kardeş kromatidinde aynı zamanda kırılma meydana gelmesiyle oluşur. Bunun sonucu olarak mitozun anafaz safhasında asentrik ve köprü fragment oluşabilir. Diğer bir olasılık ise sadece fragmentler birbirine yapışır ve metafazda bir fragment şeklinde görülürler. Başka bir olasılık ise, kırılan kromozomun iki kromatidinin sadece uçlarının yapışmasıdır. Bu durumda kırılan parçalar birbirine yapışmazlar. Buna ek olarak, hiçbir yapışmanın olmaması durumu da söz konusu olabilir. Simetrik parça değişikliği bir kromozomun aynı kromatidinde kırılma meydana gelmesi ve ardından kırılan bu parçaların karşılıklı olarak yer değiştirmesi ile oluşur. Bu olay gerçekleştiğinde mitozda görülebilir bir değişiklik meydana gelmez. Eğer kromatidlerin kırık uçları birbirlerine, kırılan iki asentrik parça da birbirine yapıştırsa asimetrik parça değişikliği meydana gelir. Bunu izleyen mitozda kardeş kromatidlerden birisi normal iken diğeri halka kromozom ile asentrik fragment şeklinde görülür. Farklı kromozomlar arasında simetrik ve asimetrik parça değişiklikleri görülmektedir. Simetrik değişiklikte, iki ayrı kromozomun birer kromatidinden kopan parçalar karşılıklı yer değiştirirler. Mitozda görülebilir bir değişiklik olmaz. Eğer kırılan parçalar birbirlerine ve kromatidlerin de kırılan uçları birbirlerine yapıştırsa, takip eden mitozda bu durum bir disentrik kromozom ve asentrik fragment şeklinde görülür. Triradial aberasyonlar, bir kromozomun tek kromatidinde, diğer kromozomun iki kromatidinde (izokromatid) kırılma meydana gelmesi ve izokromatid kırılma sonucu meydana gelen asentrik parçaların, tek

kromatid kırılması ile oluşan kırık uçlarına yapışmasıyla meydana gelir. Mitozda 3 kollu bir kromozom ile izokromatid delesyon şeklinde izlenir. Bunlardan başka oluşan kromozom aberasyonlarından biri olan inversiyonlar, bir kromozomun kopan bir parçasının 180° dönüp tekrar aynı kromozoma yapışmasıyla oluşur. İzokromozomlar ise kromozomun sentromer bölgesinden kromozom tipi enine bir kopmanın olması sonucu oluşur. Her iki kromatidinin genetik bilgileri aynı olan yeni bir kromozom meydana gelir. Gap, kromozomda kromatid kalınlığına eşit ya da ondan daha dar, boyanmamış (akromatik) bölgelere verilen isimdir. Kromozomdaki boyanmamış bölge kromatid kalınlığından fazla ise kromatid kırık olarak kabul edilmektedir (Topaktaş ve ark. 1995). Gaplar da kırıklarda olduğu gibi izokromatid veya kromatid gap şeklinde olabilir. Her iki kromatidde de gap varsa izokromatid gap, tek bir kromatidde gap varsa buna kromatid gap denir. Elektron mikroskopu çalışmalarında, gap bölgelerinde (akromatik bölgelerde) bağlantının olduğu saptanmıştır. Özellikle DNA sentezini inhibe eden bazı kimyasallar, yüksek sıklıkla gaplara neden olurlar (Natarajan ve ark. 1982). Spiral çözülmesi, kromozomda soluk boyanan bölgelerdir. Gap'a göre daha geniş bir alanı kapsar. Kromozomların kontrole göre boylarının çok kısılması ve kalınlığının artmasına kromozom kontraksiyonu denir. Bu olay kimyasal maddenin histon proteinlerine etki ettiğini göstermektedir (Topakta ve ark. 1995).

1.2.2. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

Kardeş kromatid değişimi, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenite ve kanserojenite etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Kardeş kromatid değişimi; eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan, karşılıklı segment değişimi olarak tanımlanmıştır. Kardeş kromatid değişimi sıklığının tespit edilmesi, klastojenite, genotoksisite veya genetik instabilitenin araştırılmasında kullanılır. Kardeş kromatid değişimi sıklığında ki artış, mutasyon ve kanser riskinde artışın bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu yöntem çok zaman alıyor olması ve radyoaktivite içermesinden dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadır (Ergün 2005).

Zacharov ve Egolina 1972 yılında timidin analogu olan 5-bromodeoksiüridin'i (BrdU) kardeş kromatidleri göstermek amacıyla Çin hamster

hücre kültürlerinde denemişlerdir. 5-bromodeoksiüridin replikasyon sırasında yeni yapılan DNA molekülünün yapısına girmektedir, bunun sonucu olarak da Giemsa boyası ile iki kardeş kromatid farklı olarak boyanmaktadır. Preparat, Giemsa ile boyandığında 5-bromodeoksiüridin içeren DNA daha açık boyanmakta ve floresan mikroskopta mavi yeşil renk vermektedir. Kardeş kromatid değişimi sıklığının belirlenmesi, en çok periferik kanda lenfositler üzerinde gerçekleştirilmektedir. Lenfositlerin, bir antijen olan fitohemaglutinin ile stimule edilerek bölünmeleri sağlanmaktadır. Kardeş kromatid değişimi süresince, DNA'nın duplikasyonu sırasında kromatidler arasında parça değişimi ve DNA sarmalında kırıklar oluşmaktadır. Bu olay hücre siklusunun S fazında normal olarak meydana gelmektedir. Ancak kromatidler arasındaki parça değişimi ile DNA sarmalındaki kırıklar DNA replikasyonunu engelleyen mutajenlerin etkisi altında daha sık olmaktadır (Ergün 2005).

Kardeş kromatidler arasındaki parça değişimleri ışık mikroskobu altında kolaylıkla belirlenerek, sayılabilmektedir. Kardeş kromatid değişimi sıklığı, sayılan kardeş kromatid değişimi sayısının incelenen metafaz sayısına bölünmesiyle elde edilir. Sayılan metafaz en az 30 olmakla beraber, ideal olanı ise 50 olarak bilinmektedir. Kardeş kromatid değişimi sıklığının artması, mutajenik etkinin varlığını göstermektedir. Viral enfeksiyonlar ve malign hastalıklarda kardeş kromatid değişimi sıklığı artmaktadır. Ayrıca kimyasal maddeler ve ultraviyole ışığına maruz kalmanın da kardeş kromatid değişimi sıklığını artırdığı gösterilmiştir (Ergün 2005).

Kardeş kromatid değişimi hücre bölünmesi esnasında kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmamaktadır. Hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde kardeş kromatid değişimi sıklığı artmaktadır (Altıntaş ve ark. 2005).

Kardeş kromatid değişimi sıklığının belirlenmesi hassas bir yöntemdir. Kültüre ilave edilen 5-bromodeoksiüridin miktarının değişmesi, sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir. Kardeş kromatid değişimi yönteminin dezavantajı ise çok zaman alıcı ve radyoaktivite içermesidir bundan dolayı Kardeş kromatid değişimi yöntemi yaygın olarak kullanılmamaktadır (Ergün 2005).

1.2.3. Mikronükleus (MN)

Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmenti, kromozom parçasıdır. Mikronükleus bir nükleoplazma ile sarılarak stoplazma içerisinde ana nükleusun hemen yanında yer almaktadır (Fenech 2002). Hücrelerde görülen MN, DNA hasarının bir göstergesidir. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucu DNA harabiyetine bağlı olarak oluşmaktadır (Fenech 2010). MN testi, DNA'daki hasar oranının *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmesinde en ekonomik ve pratik tekniklerden biridir. Bu yüzden kullanımı yaygındır (Fenech 2002, Thomas ve ark. 2009, Wu ve ark. 2009).

Mikronükleus yöntemi Biyoloji, Farmakoloji-Toksikoloji ve Biyokimyasal araştırmalarda kullanılmaktadır. Kanser riskinin tespitinde oldukça önemlidir. Kanser tedavisinde erken teşhis radyoterapi ve kemoterapideki başarıyı artırmaktadır (Fenech 2010). Birçok kanser tipi ile kromozom düzensizlikleri arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kanserli olgularda teşhis amacıyla mikronükleus testi yapılmaktadır. Mikronükleus Testi genotoksisitenin derecesinin belirlenmesine de hizmet etmektedir. Tedavide kullanılan iyonize radyasyonun tedavi açısından faydalarının yanında zararlı etkileri olduğu da bilinmektedir. İyonize radyasyonla yapılan tedavi esnasındaki sitotoksik etkileri de MN Testi ile belirleyebilmekteyiz. Bu nedenle MN Testi, hem kanserin teşhisinde hem de tedavi sırasında kullanılabilir (Bolognesi ve ark. 2002, Rothfub ve ark. 2000, Smimizu ve ark. 2000). Yaş artışıyla anöploid sıklığı arasında yakın bir ilişki söz konusudur. Bu nedenle MN Testinin yaygın olarak kullanıldığı bir başka alan ise yaşlanmanın tespit edilmesidir. Bireyin kromozomları yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle normal bölünmeden saptığı tespit edilmiştir. Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe yavaşlamakta ve mitoz bölünme esnasında iş iplikçiklerinde katalizör olarak görev yapan enzimlerde dejenerasyonlar ortaya çıkmaktadır (Bonassi ve ark. 2004, Elhajouji ve ark. 1997, Lindholm ve ark. 1991, Tawn ve ark. 2001, Umegaki ve ark. 2000).

Mikronükleus Tekniği, kemik iliği, insan periferik kan lenfositleri ve yanak mukoza hücrelerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu teknik basit ve az zaman almaktadır. DNA harabiyeti

konusunda güvenilir bilgi vermektedir. Bu özellikleri tekniği önemli hale getirmiştir (Fenech, M. 2000, Thomas ve ark 2009, Wu ve ark. 2009).

1.2.3.1. Fare Kemik İliği Mikro Nükleus Yöntemi

Kemik iliği, hematopoietik bir dokudur. Hematopoietik hücrelerin çoğalması sırasında bir kimyasalın uygulanması, mitotik iğ ipliklerinin baskılanmasına veya kromozom hasarına yol açmaktadır (OECD 2005). Bu test, kimyasal maddelerin etkilerine bağlı olarak, hasar görmüş kromozomlarda ortaya çıkan küçük nükleusların (MN) belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan MN çekirdeğin yanında sitoplazmada bir nükleoplazma içerisinde bulunur. Fare kemik iliği mikronükleus testinde eritrositler kullanılmaktadır. Eritroblastlar PCE'lere (polikromatik eritrositler) dönüştüğünde mitozdan yaklaşık 6 saat sonra nükleuslarını kaybederler. Bundan dolayı MN'u belirlemek daha kolay hale gelmektedir (Mavournin ve ark. 1990). Mikronükleus yüzdesini belirlemek için, polikromatik eritrositler (PCE) ve normokromatik eritrositler (NCE) kullanılır (Vijayalaxmi ve ark. 1999). Eritropoez sırasında meydana gelen nükleus hasarını tespit etmek için kullanılan bu eritrositler, boyanma özelliklerinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (Rabbani ve ark. 2005). PCE, yeterince gelişmemiş ve olgunlaşmamış eritrosit demektir. Gelişimin ara safhasındadırlar ve ayrıca ribozomları vardır. NCE, yeterince gelişmiş ve olgunlaşmış eritrositlerdir. Periferal kanda yaklaşık bir ay kalırlar ve ribozomları yoktur. PCE'ler, May Grünwald-Giemsa ile maviye boyanırken, NCE'ler ise kırmızı renge boyanırlar (Mavournin ve ark. 1990).

Mikronükleusların değerlendirilmesi belli bazı kriterlere göre yapılmaktadır. Buna göre Mikronükleusun çapı, eritrosit nükleusunun çapının yarısından daha az olmalıdır. Şekli genellikle yuvarlaktır, fakat bazen oval, halka ya da badem şeklinde de olabilir (Schmid, W. 1975). Mikronükleusun çevre sınırları çoğunlukla açıktır. Eritrosit popülasyonunda MN'un % 6'dan fazla olması, kullanılan kimyasal maddenin genotoksitesini belirlerken (Heddle ve ark. 1983, Rabbani 2005), PCE/NCE oranındaki azalma ise, kimyasal maddenin sitotoksitesini belirlemektedir. Schmid'e (1975) göre ise, normal kemik iliğinde PCE/NCE oranı

genellikle 1:1'dir (Çelik 2003, Schmid 1975). Nukleuslu hücrelerin olgunlaşması ve bölünmesi üzerine sitotoksik etkiler meydana geldiği zaman, kemik iliğinin boşluklu bir yapıda olması nedeniyle, PCE/NCE oranında azalma görülebilmektedir (Gollapudi ve ark. 1984, Schmid 1976).

Sıçan kemik iliğinde PCE'lerin yaşam süresi 10 ila 33 saat arasındadır (Cole ve ark. 1979, Salamone ve ark. 1983). Mikronükleuslu PCE sayısı aneujenler ve klastojenler uygulamalarından sonra sırasıyla 6 ile 10 saat daha uzamaktadır (Cole ve ark. 1981, Hart ve ark. 1983, Vanderkerken ve ark. 1989). Aneujenik veya klastojenik kimyasal maddeler ile muameleden 24 ve 48 saat sonra MN'li PCE'ler kemik iliğinde tespit edilebilirler (Vanparys ve ark. 1992). Bu nedenle, bir kimyasal maddenin toksik etkisini tespit etmek için, farede *in vivo* MN Testi, kimyasal madde canlıya uygulandıktan sonra, her biri 12 ve 72 saat aralığında olmak üzere üç uygulama süresi boyunca işlem yapılması önerilmektedir (EEC 1984, OECD 1983).

Kemik iliği yönteminde canlıya kimyasal madde uygulanır, muamele süresinin sonunda hayvan servikal dislokasyon ile ötenazi edilir, fetal calf serum ile femurdan kemik iliği çıkarılarak, santrifüj edilir, süpernatant atılır, pipetaj yapılır, yayma preparatları hazırlanır, fiksasyon ve boyama işleminden sonra mikroskop altında inceleme yapılır.

1.2.3.2. Sitokinezi Engellenmiş Mikro Nükleus Yöntemi

Sitokinezi-blok MN (CBMN; Cytokinesis Block MicroNucleus) analizleri, Cyt-B'nin (Cytochalasin-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliğine dayanmaktadır (Fenech 2010, Thomas ve ark. 2009, Wu ve ark. 2009). Cyt-B, *Helminthosporium dermatioideum* türü mantardan elde edilen bir ekstraktır. Sitokinez evresinde Cyt-B, aktin filamentlerini etkileyerek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Cyt-B, bu etkisini aktin filamentlerin ucuna bağlanıp, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir (Becalski ve ark. 2002, Lindholm ve ark. 1991, Tawn ve ark. 2001, Toksi ve ark. 2001, Umegaki ve ark. 2000). Yapılan bir çalışmada hücre kültürüne sitoplazma bölünmesini durduran bir aktin inhibitörü olan cytochalasin-B, mitoz esnasında ilave edildiğinde çekirdek bölünmesinin tamamlanmadığı belirlenmiştir. Sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirilemeyen çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulduran hücrelerin

oranı saptanabilmektedir. Preparat üzerinde incelenen alanlarda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlayan 4 çekirdekli hücelere de rastlanabildiği tespit edilmiştir (Kirsch-Volders ve ark. 2003).

1.2.3.3. Mikronukleus Hesaplama Kriterleri

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde bloklanan mikronukleusların hesaplanması için öncelikle hücre tiplerinin belirlenmesi gereklidir. Hücreler, mononukleus, binukleus, multinukleus, apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler. Mononukleuslu hücrelerin küçük sitoplazmaları bunun yanında büyük nükleusları vardır. Binukleuslu hücreler ise eş büyüklükteki iki hücre çekirdeği taşırlar. Bu tip hücrelerde iki nükleus nükleoplazmik köprüyle (NPB) birleşmiş olabilir. Nükleuslar birbirleri ile temas halinde veya üst üste olabilir. Multinukleuslu hücreler üç, dört veya daha fazla birbirinden farklı büyüklükte nükleus taşırlar. Bu tip hücreler pek çok sayıda MN içerebilirler. Sitokinezde bloke edilmiş hücrelerin CBMN frekansı tespit edilirken aşağıdaki özellikleri göz önüne alınır.

- MN sayımları BN'lu (Binukleus) hücrelerde yapılır.
- MN'ların çapı, ana nükleusun yarı çapının 1/16 ile 1/3'ü kadar olmalıdır.
- MN'ın alanı ana nükleusun alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
- MN'lar ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
- MN'ların çoğu nükleusların arasındadır ama aynı zamanda hücrelerin kutuplarında da olabilir.
- MN'ların yapıları küçük nükleuslara benzer. Fakat boya veya yanılmalara neden olabilecek kabarcıkları ve noktaları MN olarak kabul edilmemelidir.

Klastojenlere maruz kalmış binukleus hücrelerde nükleoplazmik köprüler de tespit edilebilir. Bu köprüler iki nükleusu birleştirirler. Köprülerin kalınlığı BN hücrelerdeki nükleus çapının 1/3 - 1/25'i arasında değişebilmektedir (Fenech 2000).

1.2.4. Ames Testi

Ames Testi çeşitli kimyasalların genotoksitesini belirlemek amacı ile histidin- ne ihtiyaç duyan bakterilerin kullanılması ile yapılan bir testir. Bu testin temelinde yapay mutasyonla histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş bakterinin

kimyasal bi- leŒiĐe maruziyet sonrası histidin oluşturabilir özelliğe dönüşmesi esasına dayanır (Akyıl 2012).

1.2.5. Comet Testi

Comet Testi tek hücre elektroforezi olarak bilinen bir testtir. DNA hasarını gös-termesi açısından önemli bir yöntemdir. Yapılması kolay, pratik ve hassas bir geno toksisite testi olarak öneme sahiptir. *İn vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilir olan Comet Testi az sayıda hücre gerektirmesi gibi avantajlara sahip bir yöntemdir (Klug ve ark. 2002).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali (Deney Hayvanları)

Çalışmada ağırlıkları 20-30 g arasında değişen, 8 haftalık erkek, *Mus musculus* cinsi swiss albino ırkı fareler kullanıldı. Mikronükleus sıklığının belirlenmesi amacıyla yapılan bu araştırmada toplam 30 adet fare kullanıldı. Fareler 121° C'de otoklave edilebilen, polikarbon malzemeden yapılmış kafeslerde barındırıldı. Hayvanlar kafeslere 10'lu gruplar halinde yerleştirildi. Fareler 20 ± 2 °C sıcaklık, % 50 bağıl neme sahip, sabah 8'den akşam 8'e kadar olan 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyotlu laboratuvar koşullarında barındırıldı. Uygulanacak maddelerin dozu distile suda çözülerek oral yol ile verildi. Kontrol grubuna sadece distile su verildi. Hayvanların bakım, beslenmesi ve üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar (KAÜ. HADEK) tarafından izin verilen ünitelerde gerçekleştirildi.

2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

2.2.1. Metomil

A firmasına ait ticari ismi X olan 200 g/l konsantrasyonunda suda çözünebilir sıvı preparat Ocak 2012 yılında üretilmiş olup son kullanma tarihi Ocak 2014'ür. Bu preparattan 0,15 ml alınıp distile suda çözdürülerek hacmi 1 litreye tamamlandı. Böylelikle 0,03 mg/ml'lik yoğunlukta çözelti elde edildi. Bu çözeltilerden farelere 3 mg/kg dozda oral yolla metomil verildi (0,06 mg/2 ml/fare/gün). Ratlarda metomilin ortalama ölüm dozu 30 mg/kg kadardır. Verilen miktar bu dozun yaklaşık % 10'una tekabül etmektedir.

2.2.2. İndoksakarb

A firmasına ait ticari adı Y olan ve 150 g/l konsantrasyonda suda çözünebilir sıvı preparat Ocak 2013 tarihinde üretilmiş olup son kullanma tarihi Ocak 2015'tir. Bu preparattan 1 ml alınıp distile suda çözdürülerek hacmi 1 litreye tamamlandı. Böylelikle 0,15 mg/ml'lik yoğunlukta çözelti elde edildi. Bu çözeltilerden farelerin

günde 15 mg/kg dozda oral yolla indoksakarb alınması sağlandı (0,3 mg/2 ml/fare/gün). Bu doz idoksakarbin ratlarda oral yolla ortalama letal dozunun yaklaşık % 1'ine tekabül etmektedir.

2.2.3. Mitomycin C (MMC)

Mitomycin C bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı (Sigma). Kapalı formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$ 'dir.

Mitomisin C'den 0,6 mg alındı ve distile suda çözdürülerek hacmi 1,5 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyondan farelere ip yolla 2 mg/kg/fare tek doz enjekte edildi. Bu uygulama fareler ötanazi edilmeden 48 saat önce yapıldı.

2.2.4. Eter (Dietil Eter, Etoksietan)

Dietileter ya da etoksietan yaygın olarak kısaca eter adıyla bilinir (CAS No :60-29-7). Kaynama noktası düşük olup, kendine özgü karakteristik bir kokusu vardır. Çalışmada anestezi madde olarak farelerin servikal dislokasyonundan hemen önce kullanıldı. Dietil eterin bazı özellikleri aşağıda verilmiştir. Diğer adları, etileter, etiloksit veya 3-oksapentan'dır. Eterin kapalı kimyasal formülü, $C_4H_{10}O$ ($C_2H_5OC_2H_5$)'dur. Molekül ağırlığı ise 74.12 g/mol'dür.

2.2.5. Sorensen Tampon (Sorensen Buffer) Çözeltisi

Bu tampon çözelti, Tampon A ve Tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olan çözeltilerin karışımıdır. Bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbiriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında kapalı kaplarda saklandı.

Tampon A: 11. 34 g KH_2PO_4 250 ml saf su içinde çözdürüldü (pH=4.8).

Tampon B: 14. 83 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ 250 ml saf su içinde çözdürüldü. (pH=9.3).

2.2.6. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerde Sorensen tamponu içinde % 5'lik ve % 10'luk boya eriyiği halinde hazırlandı. Preparatların boyanmasında kullanıldı.

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanışı: 5 ml Tampon A + 5 ml Tampon B + 5 ml Giemsa + 85 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

2.2.7. May-Grunwald

Bu boya Merck firması tarafından temin edilmiş olup, deneylerde sorenson tamponu içinde % 0,25 ve % 0,125'lik boya solüsyonu olacak şekilde hazırlandı.

2.2.8. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, cat. no. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanıldı.

2.2.9. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

Metanol sigma firmasından temin edildi. Boyama işleminden önce preparatların bekletilmesinde kullanıldı.

2.3. Çalışmada Kullanılan Deney Ekipmanları

2.3.1. Hassas Terazî

Tartım işlemlerinde 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka teraz kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

2.3.2. Santrifüj

Devir hızı 5000 rpm'e kadar yükselebilen, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj, çalışmalarda kullanıldı.

2.3.3. Mikroskop

Fotoğraf makinesi ve kamera monte edilebilen, koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemelerinde kullanıldı.

2.4. Metot

Deneyde kullanılan fareler aşağıda verildiği üzere her grupta 10 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılarak kafeslede standart diyet ve distile suyla *ad libitum* olarak beslendi. Farelere verilen maddeler distile suda çözdürülerek oral yolla içme suları ile almaları sağlandı.

2.4.1. Gruplar

Grup 1. Kontrol grubu (n=10). Bu grup, negatif grup olarak tutuldu (distile su *ad libitum* verildi).

Grup 2. Pozitif kontrol grubu (n=10). Bu grup pozitif deney grubu olarak tasarlandı. Farelere intraperitoneal (i.p) yolla, 2 mg/kg dozda Mitomycin-C (MMC) ötenaziden 48 saat önce tek doz enjekte edildi. Pozitif kontrol grubu yöntemin çalışıp çalışmadığının gösterilmesinde kullanıldı.

Grup 3. Metomil grubu (n=10). Bu gruba 3 mg/kg dozda (0,06 mg/2 ml/fare/gün) metomil oral yolla 14 gün süreyle distile su içerisinde *ad libitum* olarak verildi. Çözelti 0,03 mg/ml yoğunluğunda taze günlük olarak distile suyla hazırlandı.

Grup 4. İndoksakarb grubu (n=10). Bu gruba 15 mg/kg dozda (0,3 mg/2 ml/fare/gün) indoksakarb oral yolla 14 gün süreyle distile su içerisinde verildi.

Fareler 14 günün sonunda eter ile anestezi altında dislokasyonla ötenazi edildi. Otopsi yapılarak femur kemikleri çıkarıldı.

2.4.2. Mikronükleus Testi

Çalışmada mikronükleus tespitinde periferik kan yerine, kemik iliği kullanıldı. Çıkarılan femur kemiği mikronükleus testi için kullanıldı. Kemik iliğinden hazırlanan preparatlarda mikronükleus tespiti ilk kez Schmid (1975) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem laboratuvar ve çalışma koşullarımıza göre uyarlanarak kullanıldı (Schmid 1975).

Femur kemiği iki ucundan kesilerek, kemik iliği enjektör yardımı ile içerisinde 3 ml dana serumu bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. İçerisinde kemik iliği numunesi bulunan tüpler 2000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Tüpte kalan kısmın üzerine bir damla dana serumu konularak süspansiyon edildi.

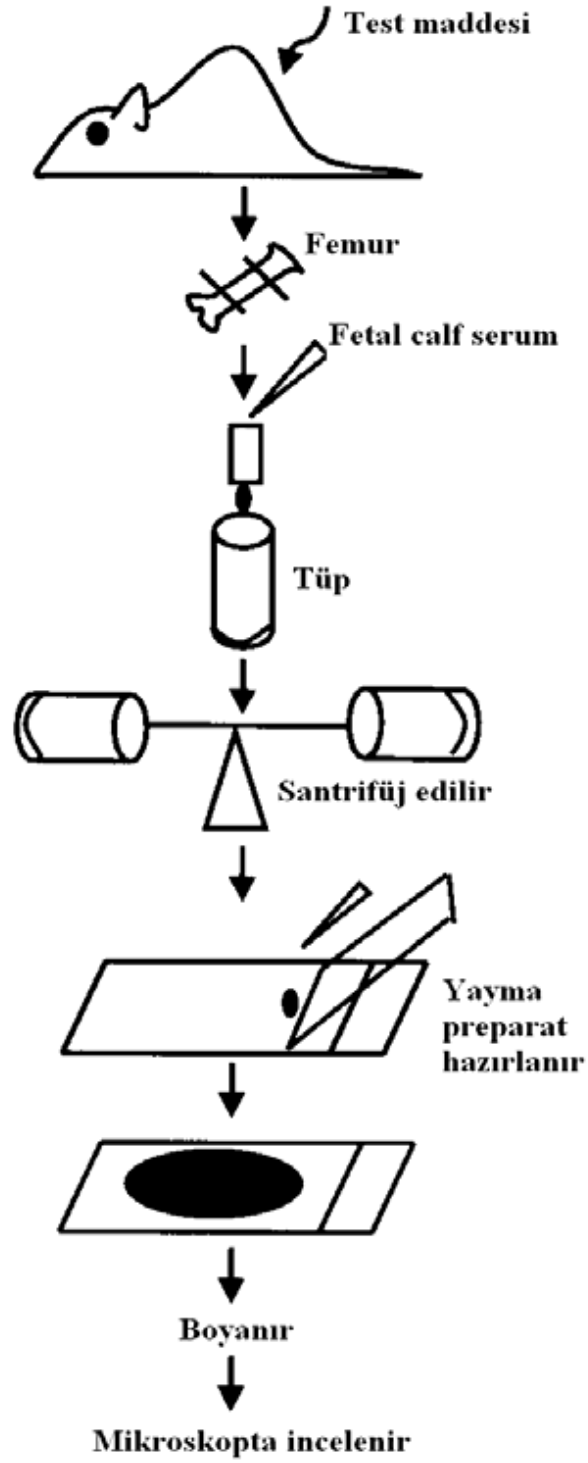
Bundan alınan bir damla örnek temiz lamlar üzerine yayıldı. Yayma işlemi tamamlanan lamlar havada kurutuldu ve metil alkolde 10 dakika fikse edildi.

2.4.3. Boyama İşlemi

Fikse edilmiş preparatlar ilk önce % 0,25'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika boyanarak saf su ile yıkandı. Daha sonra % 0,125'lik May Grunwald boyası ile 5 dakika tekrar boyanarak saf suda yıkandı. En son % 20'lik Giemsa boyası ile 30 dakika boyanıp, yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskobunda 1000 büyütmede, her preparattan rastgele 1000 adet PCE sayıldı. Bunların içerisinde MNPCE'lerin sayıları belirlenerek, yüzdeleri çıkartıldı.

2.4.4. İstatistik Yöntemi

Araştırma sonuçları SPSS paket 16 programı kullanılarak, Duncan-Tucey Testi uygulanarak gruplar arasındaki farklar istatistiki yönden belirlenmiştir. Yöntem aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Aksu 2012).



Şekil 2.1. Yöntemin özetle gösterilmesi (Aksu 2012)

3.BULGULAR

Deneye alınan hayvanlar her gün 12 saatte bir gözlemlendi. Hayvanların deney süresince hiçbirinde zehirlenme belirtileri ve ölüm görülmedi. Deney hayvanları planlanan şekilde ötenazi edilerek kemik iliğinden preparatlar hazırlandı. Farelerin kemik iliğinden hazırlanan preparatlarda sayılan PCE ve MNC'ler aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

3.1. Kontrol ve Deney Gruplarına Verilen Bileşiklerin Oluşturdukları MNPCE'ler

Farelere oral yolla metomil, indoksakarb ve intraperitonal yolla tek doz MMC verildikten sonra, her doz grubundan elde edilen preparatlardan rastgele toplam 1000 PCE sayıldı. Bu 1000 PCE içerisinde gözlemlenen MNPCE sayıları tespit edilerek Tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 3. 1. Negatif kontrol grubunda saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdelik oranları

Negatif Kontrol Grubu			
Örnek No	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	4	0,4
2	1000	3	0,3
3	1000	3	0,3
4	1000	4	0,4
5	1000	3	0,3
6	1000	3	0,3
7	1000	4	0,4
8	1000	4	0,4
9	1000	4	0,4
10	1000	4	0,4
Grup Ortalaması		3,6	0,36

Negatif kontrol grubunda toplam 10 000 adet hücre örneği sayıldı. Bu örneklerde ortalama MNPCE sayısı 3,6 olarak tespit edildi. Bu hücrelerin % olarak ortalaması ise 0,36 olarak hesaplandı.

Tablo 3. 2. Pozitif kontrol grubunda saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdelik oranı

Pozitif Kontrol Grubu			
Örnek No	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	61	6,1
2	1000	60	6
3	1000	73	7,3
4	1000	62	6,2
5	1000	65	6,5
6	1000	70	7
7	1000	70	7
8	1000	60	6
9	1000	64	6,4
10	1000	75	7,5
Grup Ortalaması		66	6,6

Pozitif kontrol grubunda toplam 10 000 adet hücre örneği sayıldı. Bu örneklerde ortalama MNPCE sayısı 66 olarak tespit edildi. Bu hücrelerin % olarak ortalaması ise 6,6 olarak hesaplandı.

Tablo 3. 3. Metomil verilen farelerde saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdelik oranı

Metomil Grubu			
Örnek No	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	22	2,2
2	1000	21	2,1
3	1000	23	2,3
4	1000	24	2,4
5	1000	28	2,8
6	1000	26	2,6
7	1000	27	2,7
8	1000	25	2,5
9	1000	25	2,5
10	1000	28	2,8
Grup Ortalaması		24,9	2,49

Metomil verilen grupta toplam 10 000 adet hücre örneği sayıldı. Bu örneklerde ortalama MNPCE sayısı 24,9 olarak tespit edildi. Bu hücrelerin % olarak ortalaması ise 2,49 olarak hesaplandı.

Tablo 3. 4. Indoksakarb verilen farelerde saptanan PCE ve MNPCE sayıları ve yüzdelik oranları

İndoxacarb Grubu			
Örnek No	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)
1	1000	11	1,1
2	1000	12	1,2
3	1000	14	1,4
4	1000	10	1
5	1000	12	1,2
6	1000	11	1,1
7	1000	13	1,3
8	1000	14	1,4
9	1000	16	1,6
10	1000	15	1,5
Grup Ortalaması		12,8	1,28

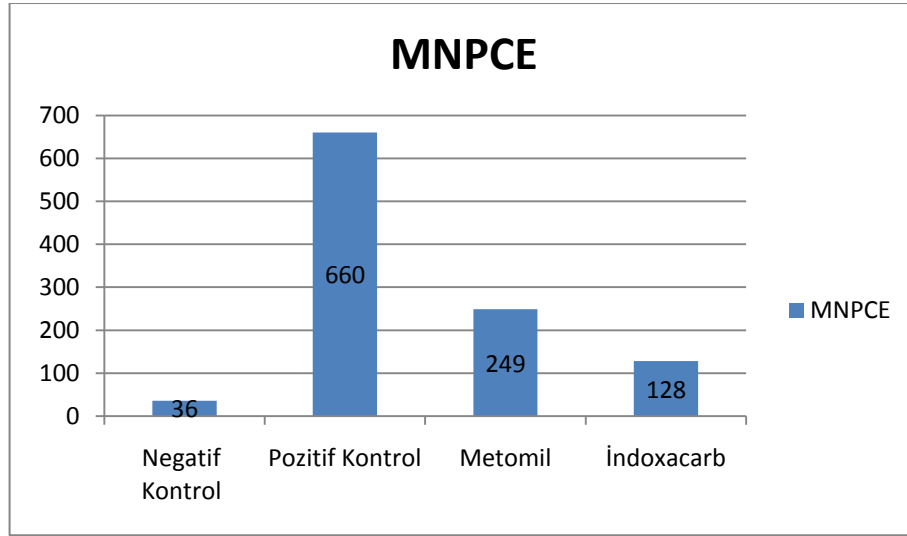
Indoxacarb verilen grupta toplam 10 000 adet hücre örneği sayıldı. Bu örneklerde ortalama MNPCE sayısı 12,8 olarak tespit edildi. Bu hücrelerin % olarak ortalaması ise 1,28 olarak hesaplandı.

Tablo 3. 5. Gruplardan saptanan toplam PCE ve MNPCE sayıları ve ortalamalar

Gruplar	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE Oranı (%)	Grup Ortalaması
Negatif Kontrol	10.000	36	0,36	3,6
Pozitif Kontrol	10.000	660	6,6	66
Metomil	10.000	249	2,49	24,9
İndoxacarb	10.000	128	1,28	12,8

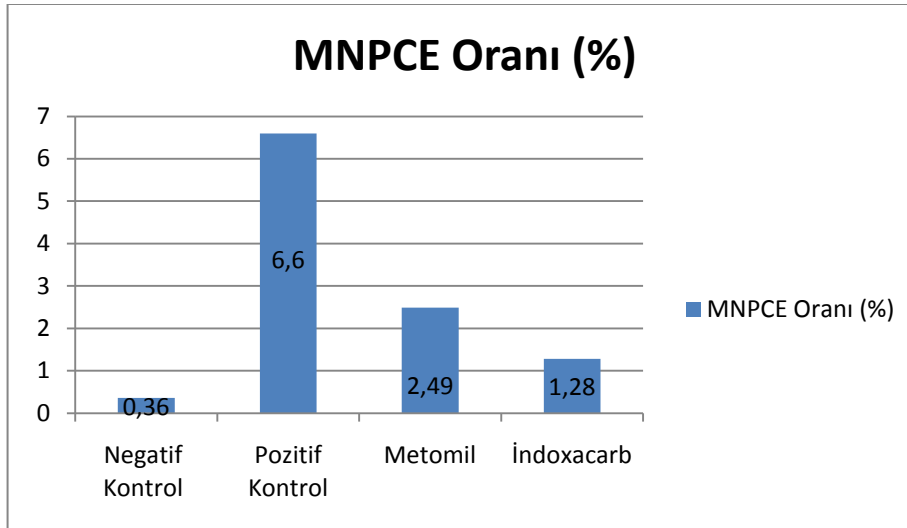
Çalışma gruplarında elde edilen değerlerin toplamı Tablo 6. 5. de verilmiştir.

6.2. Elde edilen verilerin grafiksel olarak gösterilmesi



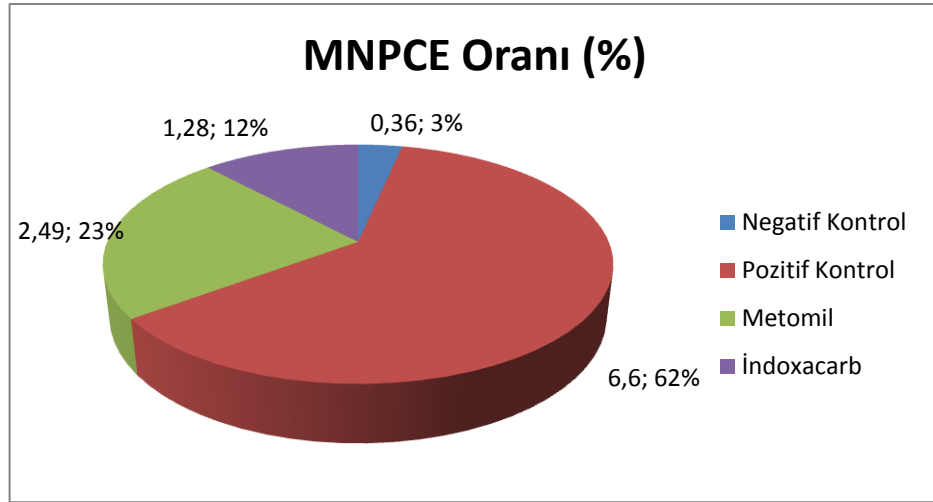
Grafik 3. 1. 10.000 PCE üzerinden bakılan MNPCE değerleri.

Grafik 6.1.'de gruplardan elde edilen toplam MNPCE sayıları grafikte sunulmuştur.

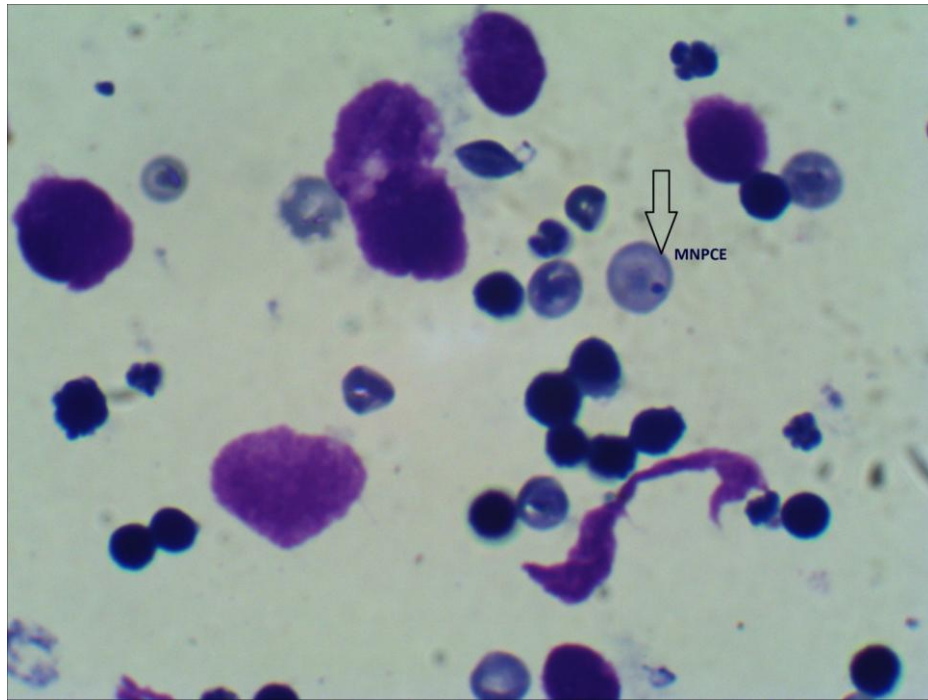


Grafik 3.2. Fare kemik iliğinde saptanan MNPCE oranları.

Grafik 6.2.'de gruplardan elde edilen toplam MNPCE sayılarının % oranları grafikte sunulmuştur.

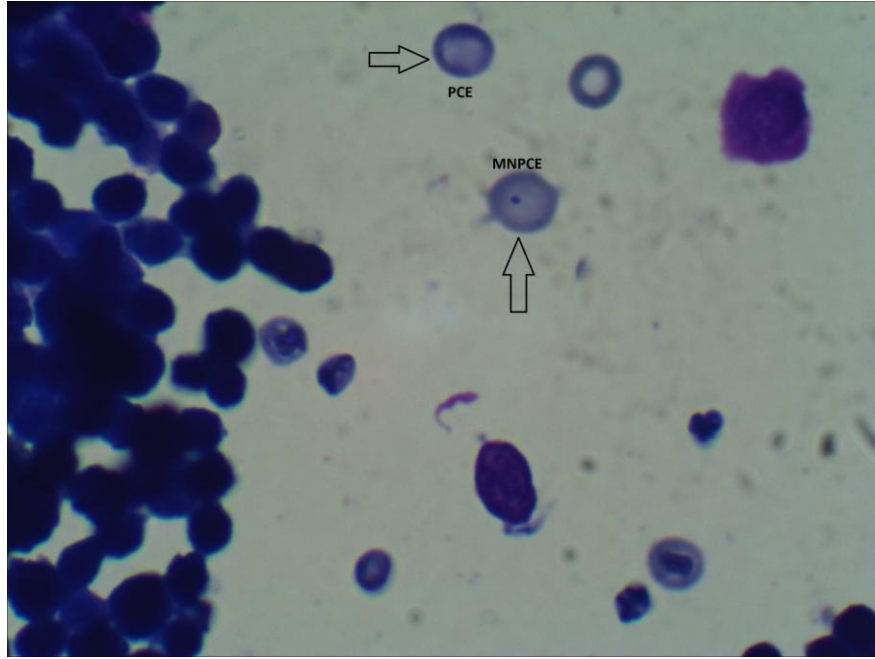


Grafik 3. 3. Toplam MNPCE sayısındaki yüzdelik dağılım.



Resim 3. 1. Yapılan çalışmada pozitif kontrol grubunda görünen bir MNPCE (200 x)

Çalışmada sayılan MNPCE'ler fotoğraflanarak Resim 6. 1.'de sunulmuştur



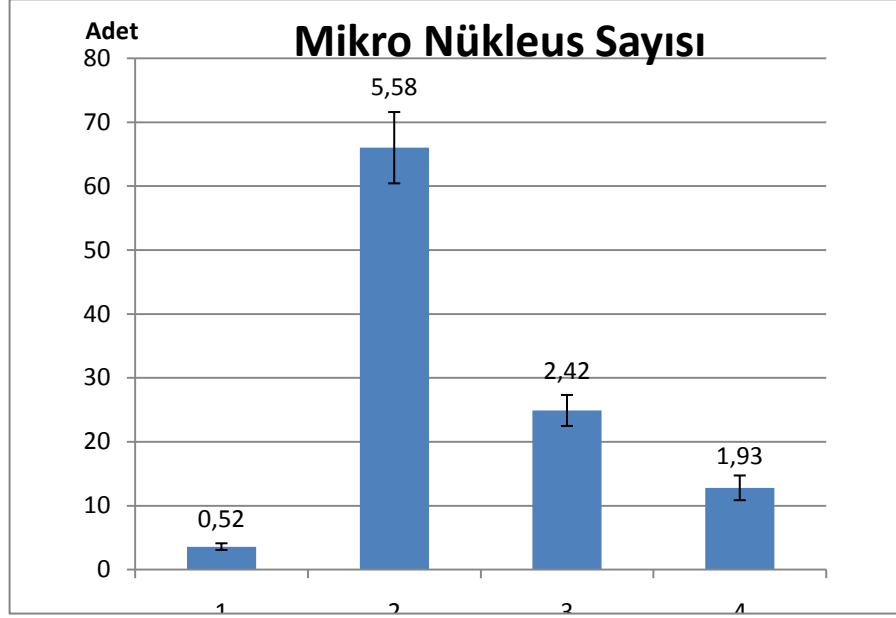
Resim 3. 2. Yapılan çalışmada pozitif kontrol grubunda görünen bir MNPCE ve PCE (200 x)

Çalışmada sayılan MNPCE ve PCE'ler fotoğraflanarak Resim 6. 2.'de sunulmuştur

Tablo 3. 6. Çalışmada kullanılan maddelerin dozları, verilen süreleri ve MNPCE sayılarının standart dağılımları

Gruplar	Verilen doz	Verilen süre	10000 PCE'de görülen MNPCE	Grup ortalaması ve standart dağılımı(n=10)
1	Distile su	14 gün	36	3,6±0,52
2	2 mg/kg	Tek doz	660	66±5,58*
3	30 mg/kg	14 gün	249	24,9±2,42*
4	15 mg/kg	14 gün	128	12,8±1,93*

*: $p < 0,001$. Grup 2, 3, 4 kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) ifade etmektedir. Ayrıca Grup 2, 3 ve 4'ün kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) bir fark olduğu tespit edildi.



Grafik 3. 4. Gruplar arası mikronükleus sayıları ve standart sapmaları.

(Grup 1: Negatif Kontrol Grubu, Grup 2: Pozitif Kontrol Grubu, Grup 3: Metomil verilen grup Grup 4: İndoksakarb verilen grup)

SPSS 16 paket programı kullanılarak Duncan-Tucey yöntemi kullanılarak gruplar arasındaki istatistiksel yorumlama yapılmıştır. İstatistik sonuçlarda grupların birbirlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Metomil'in negatif kontrole kıyaslandığında mikronükleus sayısını belirli bir şekilde arttırdığını gözlemlenirken, pozitif kontrol grubuna kıyasla düşük mikronükleus oluşumuna sebep olmuştur. Metomil verilen gruptan elde edilen sonuçlar İndoksakarb verilen gruptan elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermekle birlikte Metomil'in İndoksakarb'dan daha fazla mikronükleus sayısını arttırdığı görülmüştür.

Sonuçlar doğrultusunda İndoksakarb'ın negatif kontrol grubuna göre yüksek oranda mkronkleus oluşturduğu gözlemlenirken, pozitif gruba göre daha düşük mikronükleus sayısı oluşturduğu gözlemlenmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada farelerin kemik iliği hücrelerinde organik karbamat grubu insektisitlerden olan metomil ve indoksakarbın genotoksik etkileri fare kemik iliği hücrelerinde Mikronükleus Testi ile araştırıldı.

Test amacıyla kullanılan metomil ve indoksakarb insektisidal mücadelede yaygın kullanılan ilaçlardır. Yaygın kullanılmalarının nedeni tarım ürünlerinin zararlı etkenler olarak adlandırılan insektisitlerden korunmasıdır. İnsektler tarım zararlıları, yani pestler içerisinde incelenen canlılardır. Pestler bütün dünyada yaygın olarak bulunan canlılar olup, tarım ürünlerine önemli ölçüde zarar verirler.

Pestlere karşı kullanılan pestisitler tarım ürünlerinin zarar görmesini engelleyerek işletmenin karlılığını artıran önemli ilaçlardandırlar. Bu nedenle pestisit kullanımını artıran en önemli neden besine olan ihtiyaçtır. Bu durum nüfus artışı ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca tarım alanlarının korunmaması ve giderek daraltılmasının burada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Besine olan ihtyacin artması mevcut tarım alanlarından daha fazla ürün elde etmeyi ve elde edilen ürünün daha uzun süre muhafazasını zorunlu olarak gündeme getirmiştir. Bu amaçla sulama, gübreleme, pestisit uygulama ve ürünlerin genetik yapılarının çevre şartlarından etkilenmeyecek şekilde iyileştirilmesi yapılmaktadır. Bu işlemler ile önemli ölçüde tarımsal ürün artışı ve korunması elde edilmiştir. Bu durum doğal olarak hem tüketicilerin beslenmesine hem de üreticilerin daha fazla ekonomik çıkar elde etmesine neden olmuştur. Ancak bu yöntemler o kadar masum değillerdir. Ciddi anlamda olumsuz etkileri de vardır. Araştırmalarla ortaya konan ve ispatlanan bu etkilerin çevre üzerinde çok sayıda ihmal edilemeyecek derecede hatta doğa tarafından tolere edilemeyecek şekilde zararları da söz konusudur. Bunların hakkında zaman zaman ciddi tartışmaların da yapıldığı bir gerçektir. Araştırcıların bir kısmı kullanılmalarının zorunlu olduğu ve zararlı etkilerinin azaltılmasının gerekliliğini ileri sürerken, diğer bir kısmı ise doğanın hiçbir şekilde zorlanmamasını ileri sürmektedirler. Ancak gerçek pestisitlerin doğa ve canlılara üzerindeki zararlarının olduğudur.

Pestisitler canlılara ya doğrudan ya da dolaylı olarak bir şekilde değişen miktarlarda yansımaktadır. Bu yansıma doğal olarak canlılara olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Alınan miktarlara bağlı olarak akut veya kronik tipte etkiler doğurabilirler. Etkiler ilaçların türüne, dozuna ve hayvanlara göre farklılık arz edebilir. Pestisit ve diğer çevre kirleticilerin bu etkileri arasında hiç kuşkusuz gen toksisitesi büyük önem arz etmektedir. Genotoksisite insan ve hayvan sağlığı açısından tüm dünyada üzerinde durulan ve önem arz eden konuların başında gelmektedir. Bu nedenle genotoksisite alanında çok sayıda çalışmanın yapıldığı görülmektedir.

Gen toksisitesi değişik şekillerde olabilmektedir. Bulardan biri canlı türlerinin kendilerine özgü genetik bilgilerini taşıyan genlerde çeşitli sebeplerle ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerdir ki, bunlara mutasyon denir. Mutasyonlar kendiliğinden oluşabileceği gibi mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana getirilebilirler. Mutajenler DNA molekülünde hasar oluşturabilirler. Bu hasarların bir kısmı hücrede özel mekanizmalar ile onarılabileceği gibi bazen de bu onarım mekanizmalarının çalışmasını kontrol eden genlerdeki mutasyon sonucu ya da yaş, hastalıklar, beslenme, ısı gibi şartların etkisiyle onarılamayabilir. Bunun sonucu olarak da o hücrenin genlerindeki mutasyon artık kalıcı hale gelir (Galloway ve ark. 1998, İpek ve ark. 2003). Bu mutasyonlar somatik hücrelerde ya da eşey hücrelerinde görülebilir. Eşey hücrelerinde görülen mutasyonlar gelecek nesillere aktarılabilir veya canlının üreme fonksiyonlarını bozabilir. Karbamat grubu insektisitler de genotoksisiteye neden olabilirler. Genotoksisiteyi belirlemek için farklı yöntemler kullanılır. Bunlardan bazıları Mikronükleus Testi, Kardeş Kromatit Testi, Kromozom Aberasyonu Testi, Ames Testi ve Comet Testleridir.

Kardeş Kromatid Değişimi (KKD); eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan, karşılıklı segment değişimi olarak tanımlanmaktadır. Kardeş kromatid değişimi sıklığının tespit edilmesi, klastojenite, genotoksisite veya genetik instabilitenin araştırılmasında kullanılır. Zacharov ve Egolina 1972 yılında timidin analogu olan 5-bromodeoksiüridin'i kardeş kromatidleri göstermek amacıyla Çin hamster hücre kültürlerinde denemiştir. 5-bromodeoksiüridin replikasyon sırasında yeni yapılan DNA molekülünün yapısına girmekte, bunun sonucunda Giemsa boyası ile iki kardeş kromatid farklı olarak boyanmaktadır. Preparat, Giemsa ile boyandığında 5-

bromodeoksiüridin içeren DNA daha açık boyanmakta ve floresan mikroskopta mavi yeşil renk vermektedir. Kardeş kromatid değişimi sıklığının belirlenmesi, en çok periferik kanda lenfositler üzerinde gerçekleştirilmektedir (Ergün 2005). Kardeş kromatid değişimi sıklığının belirlenmesi hassas bir yöntemdir. Kültüre ilave edilen 5-bromodeoksiüridin miktarının değişmesi, sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir. Kardeş kromatid değişimi yönteminin dezavantajı ise çok zaman alıcı ve radyoaktivite içermesidir bundan dolayı Kardeş kromatid değişimi yöntemi yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Kromozomların yapı ve sayısındaki değişimlere kromozom aberasyonları (KA=CA) denir. Bu değişiklikler sonunda genlerin sayı ve yerleşim düzenleri değişir. Bunun sonucu olarak farklı genotipik özellikler ortaya çıkar. Bu da gelecek nesillerde canlıların fenotipine yansır. Kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozomlar yapısal kromozom aberasyonlarıdır (Natarajan ve ark. 1982). Gap, kromozomda kromatid kalınlığına eşit ya da ondan daha dar, boyanmamış (akromatik) bölgelere verilen isimdir. Kromozomdaki boyanmamış bölge kromatid kalınlığından fazla ise kromatid kırık olarak kabul edilmektedir (Topaktaş ve ark. 1995). Gaplar da kırıklarda olduğu gibi izokromatid veya kromatid gap şeklinde olabilir. Her iki kromatidde de gap varsa izokromatid gap, tek bir kromatidde gap varsa buna kromatid gap denir. Elektron mikroskobu çalışmalarında, gap bölgelerinde (akromatik bölgelerde) bağlantının olduğu saptanmıştır. Özellikle DNA sentezini inhibe eden bazı kimyasallar, yüksek sıklıkla gaplara neden olurlar (Natarajan, ve ark. 1982). Spiral çözülmesi, kromozomda soluk boyanan bölgelerdir. Gap'a göre daha geniş bir alanı kapsar. Kromozomların kontrole göre boylarının çok kısılması ve kalınlığının artmasına kromozom kontraksiyonu denir. Bu olay kimyasal maddenin histon proteinlerine etki ettiğini göstermektedir (Topaktaş ve ark. 1995).

Büyükçoban T. (2010) yaptığı bir çalışmada aynı liganda sahip birden çok metal tuzunun insan periferik kan lenfositlerindeki genotoksik etkilerinin kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (CA) ve sitokinez bloklama mikronukleus yöntemleriyle (CBMN) in vitro ortamda incelenmiştir. Metal tuzları 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Test sonucunda iki farklı metal tuzu her üç testte de mutajenik etki gösterdiği halde yalnız bir metal tuzu mikronukleus ve kardeş

kromatit değişimi şeklinde mutajenik etki göstermiştir. Ancak bu madde kromozom aberasyonları testinde mutajenik etki göstermemiştir (Büyükçoban 2010). Bu durum mutajenite testlerinin duyarlılığının farklı olabileceğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla genotoksisite teslerinin seçiminde laboratuvar şartlarının yanında testlerin uygulanabilirliği ve duyarlılıklarının de dikkate alınması araştırma sonuçların güvenirliliği açısından önerilebilir.

Ames Testi çeşitli kimyasal maddelerin genotoksisitesini belirlemek amacı ile histidine ihtiyaç duyan bakterilerin kullanılması ile yapılan bir testir. Bu testin temeli histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş bakterinin kimyasal bileşiğe maruziyet sonrası histidin oluşturabilir bir özelliğe dönüşmesi esasına dayanır (Akyl 2012). Eğer bakteriler histidinsiz besi yerlerinde üreyebiliyorlarsa mutasyona uğradıkları sonucuna varılabilir. Çoğu mutajenite veya genotoksisite araştırmalarında *S. typhimurium* bakterisinden bu amaçla yararlanılabilmektedir. Bu test uygulanması kolay ve fazla ekipman gerektirmemesi nedeniyle çoğu zaman tercih edilebilmektedir.

Oęuz S. (2011) yaptığı bir çalışmada ilaç hammaddesi olarak kullanılan metilfenidatın mutajenik ve karsinojenik etkisi ames testi kullanılarak araştırılmıştır. Yöntemde *S. typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşları ile çalışılmıştır. TA 100 baz çifti değişimine, TA 98 ise çerçeve kaymasına yol ačan mutajenlerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde gerçekteştirilmiştir. Test sonuçlarının ortalaması alınarak, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, metilfenidatın TA 100 ve TA 98 suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda mutajenik aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir. Mutajenite olmadığı için bunun bir basamak ilerisi olan ilaca bağlı karsinojeniteden bahsedemeyeceği ileri sürülmüştür (Oęuz 2011).

Comet Testi tek hücre elektforezi olarak bilinen bir testtir. Yapılması kolay, pratik ve hassas bir genotoksisite testi olarak öneme sahiptir. *In vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilir olan comet testi az sayıda hücre gerektirir. DNA hasarının göstergesi diğer bir avantajıdır (Klug ve ark. 2002). Son yıllarda genotoksisite çalışmalarında diğer testlere göre daha hassas sonuçlar vermesi nedeniyle sıkça tercih edilmektedir.

Akan T. (2012) yaptığı bir çalışmada organofosforlu bir pestisit olan klorofosun arpa bitkisi ve zebra balığı üzerindeki genotoksik etkisini belirlemede comet testi kullanılmıştır. Araştırmada farklı konsantrasyonlarda verilen klorofosun 6, 12, 18 ve 96. saatler sonunda DNA hasarlarına bakılmıştır. Elde edilen comet testi bulguları klorofosun DNA kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle klorofos hem bitkilerde hem de balıklarda genotoksik etkiye sahip bir kimyasal ajan olduğu araştırma ile tespit edilmiştir. Klorofosun farklı doz ve sürelerine genotoksik ajanlara maruz kalan her iki organizmada da farklı seviyelerde genotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği tespit edilmiştir (Akan 2012). Bu sonuçlar klorofosun genotoksik etkilerini ortaya koymasının yanında bitki ve balıklarında genotoksik araştırmalarda gerektiğinde kullanılabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Bu araştırmada genotoksisitenin belirlenmesinde Mikronükleus Testi kullanılmıştır. Mikronükleus hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmenti, kromozom parçasıdır. Bir nükleoplazma ile sarılarak stoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer almaktadır (Fenech 2002).

Mikronükleus Tekniği, kemik iliği, insan periferik kan lenfositleri ve yanak mukoza hücrelerinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu teknik basit ve az zaman almaktadır. Aynı zamanda DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi de vermektedir. Bu özellikleri tekniği önemli hale getirmiştir (Fenech 2000, Thomas ve ark. 2009, Wu ve ark. 2009).

Aksu P. (2012) yaptığı bir çalışmada yüksek ısıda üretilen gıdalarda ortaya çıkan akrilamid'in genotoksisitesinin olup olmadığını belirlemek için fare kemik iliğinde kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozom aberasyonu (CA), mikronükleus (MN) testleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda akrilamid'in *in vivo* ve *in vitro* klastojenik etkisinin olduğu saptanmıştır (Aksu 2012). Araştırmada mikronükleus testine ilaveten kromozom aberasyonlarından da genotoksisitenin belirlenmesinde yararlanılmıştır. Çalışma hem *in vitro* hemde *in vivo* olarak planlanarak akrilamidin gen toksisitesi doğrulanmıştır. Bu toksisiteyi polifenolik bileşilerin önleyebildiği de aynı çalışmada gösterilmiştir.

Cicchetti ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada organoklorid grubundan olan dialdrin molekülünün *in vivo* çalışmasıyla fare kemik iliğinde mikronükleus yöntemiyle genotoksisitesine bakılmıştır. Dialdrin'in 60 mg/kg ve 90

mg/kg subletal ve letal dozları intraperitoneal olarak farelere uygulamıştır. Subletal doz canlıının en az 48 saat yaşayabileceği şekilde hesaplanırken, letal doz canlıının en az 24 saat yaşayabileceği şekilde ayarlanmıştır. Bu saatler sonrası Dialdrin'in letal ve subletal dozları verildikten sonra 24 ve 48 saat bekleme sonrası kemik ilikleri çıkartılarak mikronükleus sayısı araştırılmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında subletal doz $p < 0,05$ oranında istatistiksel anlamda önemli bir artış gösterirken letal doz $p < 0,01$ gibi istatistiksel anlamda bir artış göstermiştir (Cicchetti R. ve ark. 1999).

Literatür taramasında Kevekordes ve arkadaşlarının 1996 yaptıkları bir çalışmada karbamat grubu bazı pestisitlerden aldicarb'ın genotoksik etkisine *in vivo* olarak fare kemik iliğinde mikronükleus testiyle bakılmıştır. Bileşiğin letal dozlarının yüzde 50-80-100-115'lik katlarına denk gelen dozları erkek farelere, letal dozlarının % 80 ve % 100'lük dozlarına denk gelen miktarları ise dişi farelere verilmiştir. Her doz 4 dişi ve 4 erkek fareye 200 ya da 300 ml mısır yağında çözdürülerek oral yolla gavaj yapılmıştır. Hayvanlar dişi erkek olarak kafeslere ayrılmış normal diyet ve içme suyu olarak çeşme suyu verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak erkek farelere 600 mg/kg, dişi farelere de 450 mg/kg dozda olacak şekilde siklofosamid verilmiştir. Negatif kontrol grubuna ise sadece mısır yağı oral yolla uygulanmıştır. Hayvanlar 48 saat sonra karbondioksit gazıyla bayıltılıp servikal dislokasyonla ötenazi edilmiştir. Kemik iliğinden hazırlanan preparatlarda mikronükleuslara bakılmıştır. Bin eritrosit içinden polikromatit eritrosit sayısı belirlenmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde PCE/MNPCE oranı erkek farelerle kıyaslı dişi farelerde daha yüksek görülmüştür. Çalışmada bu farklılığın sebebi anlaşılmamakla birlikte laboratuvar koşullarına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Aldicarbın verildiği dozlarda PCE/MNPCE sayısında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark görülmemiştir. (Kevekordes ve ark. 1996). Burada dişilerin aldicarbin genotoksik etkilerine karşı daha hassas olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu durum muhtemel olarak hormon farklılıkları ya da hormonların neden olduğu fizyolojik farklılıklardan kaynaklanma ihtimalini taşımaktadır. Dolayısıyla pestisitlerin bu tür toksik etkilerine karşı gösterilen farklı duyarlılık durumlarına dikkat çekilmelidir. Özellikle mutasyon açısından ilgili durumun geniş bir şekilde ele alınarak değerlendirilmelidir.

Bu yöntemler DNA'da genotoksisitenin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Literatür taramalarında genotoksisite araştırmaları karşımıza oldukça fazla sayıda çıkmaktadır. Bu durum genotoksik araştırmalara olan ilgiyi ve

genotoksisitenin öneminin anlaşılmasını sağlaması açısından oldukça dikkate değerdir. Yapılan bir çalışmada Portekiz'de 33 çiftçinin MN, SCE ve CA testleri kullanılarak lenfositlerindeki sitogenetik hasar belirlenmeye çalışılmıştır. Kontrol grubu olarak aynı bölgede yaşayan ancak pestisitlere maruz kalmayan kişiler seçilmiştir. Test sonucuna göre çiftçilerin MN ve SCE sıklığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek çıktığı saptanmıştır ($p < 0.005$), CA sonuçlarında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Costa ve ark. 2006). Bu durum MN Testinin CA Testinden daha duyarlı olabileceğın kesin olmamak şartıyla ortaya koyması açısından dikkat çekmektedir.

Pestisit üretiminde çalışan 54 işçi ile pestisit maruziyeti olmayan 54 kişi pestisitlerin genotoksik etkilerini araştırmak için CA ve MN analizleri yapılmıştır ve pestisit üretiminde çalışan işçilerde CA ve MN sıklığında istatistiksel açıdan bir artış gözlenmiştir ($p < 0.005$). (Sailaja ve ark. 2006). Bu araştırma sonuçları pestisitlerin genotoksik etkilere neden olabileceğı fikrini doğurmaktadır.

Pastor ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları bir çalışmada karbamat grubu intektisitlerin (metomil dahil) içinde bulunduğu bir çalışmada 49 Polonyalı çiftçinin yaygın olarak kullandığı pestisitlerin periferal kandaki lenfositler ve ağız içi epitel hücrelerinde pestisit maruziyeti sonrası mikronükleuslarına bakılmıştır. Kontrol grubu olarak aynı bölgede yaşayan 50 tane pestisit maruziyeti olmayan erkek denek seçilmiştir. Yapılan kıyaslamada her iki hücre tipi için istatistiksel bir fark görülmemiştir (Pastor ve ark. 2001).

Ergene (2007) yaptığı bir çalışmada Göksu deltasında organofosfat ve karbamat grubu dahil olmak üzere karışık pestisitlerin yaygın olarak kullanıldığı sahada sigara içen ve sigara içmeyen kişilerin ağız epitelyum hücrelerinde bakılan mikronükleus sayısını kontrol grubuna göre kıyaslanmış ve mikronükleus sayısında sigara içen ve içmeyen toplam 32 şer kişilik grupta $p < 0,01$ değerinde istatistiksel önem arz eden bir artış saptamıştır. Benzer şekilde binükleus görülen hücre sayısında da artış gözlemlenmiştir (Ergene ve ark. 2007). Bu anlamda sigara içmenin mikronükleus sayısında artış üzerinde bir etkisinin olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

İnsan periferal kan lenfositlerinde bir herbisit olan trifluralin'in genotoksisitesinin saptanması için SCE, MN ve CA Testleri kullanılarak bir çalışma

yapılmıştır. Trifluralin zayıf sitogenetik etkiye sahip olduğu bilinen bir kimyasaldır. Çalışma sonucunda SCE sıklığının istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı gözlenirken, CA ve MN Testleriyle herhangi bir genotoksik etki görülmemiştir (Ribas ve ark. 1996).

Dünya nüfusu her geçen gün giderek artmaktadır. Artan bu nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için tarım ürünlerinden daha fazla verimin alınması gerekmektedir. Bu insan ve hayvanların sağlıklı bir şekilde beslenmeleri için şarttır. Bu amaçla yeterli derecede tarımsal üretimin sağlıklı bir şekilde elde edilmesi büyük bir önem arz etmektedir. Günümüzde tarım alanlarından daha fazla verimi artırmak için ürünlerin korunması da özellikle 1950’li yıllardan sonra gündeme gelmiştir. Bu amaçla tarım ürünlerine zarar veren canlılara karşı çeşitli kimyasal maddelerin kullanıldığı görülmektedir ki, bunlara genel anlamda pestisitler adı verilir. Zararlılarla yapılan entegre mücadele yöntemi tarımsal mücadelenin insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri en az olmasına dikkat edilmelidir. Seçilecek yöntem çevreye, uygulayıcı ve ürünlere en az toksik yapacak şekilde olmalıdır. Bu nedenle en iyi ve etkili, ayrıca zararı en düşük olan mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. İlaçlamalar ürünün hem yetiştirme esnasında hem de yetiştikten sonra tüketilinceye kadar bozulmasının önüne geçilmesini amaçlamaktadır. Bu yüzden özellikle böceklere karşı kullanılan ve insektisit adı verilen ürünlerin kullanımı günümüzde oldukça yaygın bir durumdur. Her ilaç için söz konusu olan uygun doz gerekliliği bu ilaçlar için de söz konusudur. Çünkü uygun dozların üzerinde verilen her ilacın zehir etkisi göstermesi içten bile değildir. Bu faydalı etkilerinin yanında uygulandıklarında bazı olumsuz etkileri de gündeme gelebilir. Özellikle yanlış doz ve uygulama süresi bariz tanımlanabilen zararlara neden olabilir. Bu nedenle pratikte çeşitli alanlarda kullanılmaları çevre sağlığı açısından büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır. Uygulanmaları esnasında gereken özen gösterilmediği takdirde toprak, su, hava ve besin kirlenmesine yol açarak ekolojik dengenin bozulmasına neden olabilmektedirler (Yiğit ve ark. 2008, Doğan 2012). Bu anlamda pestisit kalıntılarının, çevrede parçalanma yarı ömürlerinin belirlenmesi ve olumsuz etkilerini araştırılması büyük önem arz etmektedir. Bu etkilerden biri de kuşkusuz gen toksisitesidir.

Sivrikaya’nın (2006) yaptığı bir çalışmada Aralık 2003 ve Ocak 2004 tarihleri arasında Değirmendere havzasında pestisit kalıntılarının su ve toprakta yaptığı

kirlilik araştırılmıştır. Bu çalışmada Değirmendere havzasının seçilme nedeni bölgedeki suyun içme suyu kaynağı olarak kullanılması ve bölge insanının genel olarak ziraatle uğraşıyor olması etkili olmuştur. Bölgede kullanılan 22 farklı pestisit türü çalışmaya konu edilmiştir. Bu çalışmada pestisitlerin yer altı sularına sızma, doğada uzun süre kalma özelliği su ve toprak örnekleri alınarak bakılmıştır. Ayrıca yaş sebze ve meyvelerde pestisit kalıntılarına bakılmıştır. Bu çalışma sonucunda alınan numunelerde pestisit kalıntılarına rastlanılmış, ancak bu değerlerin sağlık açısından izin verilen maksimal değerlerin altında olduğu saptanmıştır (Sivrikaya 2006). Çevrede ve hayvan ürünlerinde pestisit tespit edilmesi önemlidir. Ancak tespit edilen her miktar sağlık açısından önem arz etmeyecek düzeylerde olabilir. Bunun için ilaçların tolerans düzeylerinden yararlanılmaktadır.

Önemli pestisit türleri arasında olan karbamat grubu insektisitler 1950'li yıllardan beri yaygın kullanılan bileşiklerdir. Özellikle çevrede diğer bazı sentetik insektisitlere göre kolay parçalanmaları ve etki mekanizmaları nedeniyle toksisite açısından daha avantajlı durumda olmaları, yaygın kullanılmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Organik karbamat grubu insektisitlerin çevredeki parçalanma yarı ömürlerini ve kalıcılıklarını bazı faktörler etkilemektedir. Kullanılan bileşiğin uçuculuğu, sudaki çözünürlüğü, uygulanan toprağın tipi, toprak nemi, adsorpsiyon özelliği, pH'sı, çevrenin sıcaklığı ve ışık gibi nedenler bu faktörler arasında sayılabilir. Bu faktörler kullanılan pestisitinin çevredeki parçalanma yarı ömrünü, dolayısıyla topraktaki biyobirikimlerini doğrudan etkiler. Bunların içerisinde en önemlileri toprak tipi ve insektisitinin sudaki çözünürlüğüdür. Karbamat türevi insektisitlerin topraktaki kalıcılıkları ve sudaki kirletici özellikleri hedef olmayan organizmalar üzerinde sağlık açısından tehlike arz etmektedir (WHO 1986). Bu sebeple kolay parçalanan ve kalıcı olmayan karbamat türevlerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Yapılan bir çalışmada sarıyar baraj gölünde çevre kirliliğini araştırmak üzere iki yıl boyunca gölün farklı bölgelerinden toplanan farklı beslenme alışkanlıklarına sahip sazan, yayın ve çay balıklarının karaciğer ve beyin dokusu örneklerinde bulunan enzimlerine bakılmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında farklı mevsimlerde ve farklı bölgelerden toplanan balıkların enzim aktivitelerinde önemli düzeylerde farklılıklara rastlanmıştır. Enzim aktivitelerindeki bu değişimler mevsimsel farklılıklardan, ayrıca tarım ve endüstriyel faaliyetlere bağlı olarak çevrenin

kirlenmiş olmalarına bağlanmıştır. Baraj gölünde oluşan bu kirliliğin Sakarya nehrinden baraja karışan ağır metaller ve tarımda kullanılan organofosfatlı ve karbamat türevi insektisitlerin sebep olduğunu düşündürmektedir (Güngördü 2001).

Keleş (1991) yaptığı bir çalışmada karbamat grubu insektisitlerden karbaril ve propoksurun tavuklardaki akut zehirlenmeleri ve tedavi uygulamaları incelenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubuna oranla önemli oranda inhibisyon gözlenmiş, ortaya çıkan en belirgin kolinerjik semptomlar diyare, koordinasyon bozukluğu, solunum hızında artış ve salivasyon olarak tespit edilmiştir. Araştırmada zehirlenelerin tedavisinde ise atropin kullanılmıştır (Keleş 1991).

Erdağ (2012) yaptığı bir çalışmada organofosforlu pestisitlerden malatyonun yanlış kullanımı sonucu oluşan oksidasyonun zararlı etkilerini gidermek üzere bazı bitkilerin metanol özütlerinin etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda bazı bitkilerde bulunan metanol özütlerinin malatyonun oksidasyon ürünlerine karşı antioksidan özellik göstererek zararlı etkilerini giderdikleri anlaşılmıştır (Erdağ 2012).

Bu araştırmada farelerin kemik iliği hücrelerinde organik karbamat grubu insektisitlerden olan metomil ve indoksakarbin genotoksik etkileri Mikronükleus Testi kullanılarak araştırıldı. Bu araştırmada diğer yöntemlerin kullanılmamasının nedeni daha hassas ve karmaşık olmalarıdır. Örneğin Kardeş Kromatid Değişimi Testinde, kardeş kromatid değişim sıklığının belirlenmesi oldukça hassas bir yöntem gerektirmektedir. Kültüre ilave edilen 5-bromodeoksiüridin miktarının değişmesi, sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir. Kardeş Kromatid Değişimi yönteminin diğer bir dezavantajı ise çok zaman alıcı ve radyoaktivite içermesidir. Kromozom Aberasyonları Testi birden çok değişikene bakarak deney yapma gerekliliğini zorunlu kılmaktadır. Ames Testi ise histidine ihtiyaç duyan standart bakterilerin kullanılması ile yapılan bir testir. Bu testin temelinde yapay mutasyonla histidin sentezleme yeteneğini kaybetmiş bakterinin kimyasal bileşiğe maruziyet sonrası histidin oluşturması gerekliliği olduğundan standart şuşların kullanımını gerektirdiğinden dolayı çalışmada kullanmayı olumsuz etkiledi. Comet Testi ve Mikronükleus yöntemlerinden birinin seçilmesi bu kriterler göz önüne alındığında daha uygun gibi görünmektedir. Çalışmada Mikronükleus Yöntemini kullanmada amaç Mikronükleus Tekniği, kemik iliği, insan periferik kan lenfositleri ve yanak mukoza hücrelerinde

kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmasıdır. Bu teknik basit ve az zaman almaktadır. DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermektedir. *In vitro* olarak uygulanması, gözleme dayalı olması ve laboratuvarımızın şartları düşünüldüğünde bu çalışmamızda en kullanışlı yöntem olduğu değerlendirilmiş ve diğer yöntemlere göre daha bir öne çıkmıştır.

Bu çalışmada kullanılan organik karbamat grubu insektisitlerden olan metamilin kapalı formülü $C_5H_{10}N_2O_2S$ 'dir. Metomilin IUPAC ismi (*E,Z*)-metil *N*-{[(methylamino) karbonil]oksi}etanimidothioate.'dır (EPA sınıfı 1 dir) (Pastor ve ark. 2001).

Metomil kolinesteraz enziminin geri dönüşümlü bir inhibitörüdür. Sistemik insektisit ve akarisit özelliğindeki bu pestisit aynı zamanda kontak ve mide zehri etkisi de vardır. Özellikle Lepidoptera, Hemiptera, Homoptera, Diptera and Coleoptera takımlarından çok sayıda böcek ve kırmızı örümcek türüne karşı meyve, bağ, zeytin, sebze, süs bitkisi ile keten, pamuk, soya fasulyesi gibi çok sayıda kültür bitkisinde kimyasal savaş maddesi olarak yaygın kullanılmaktadır. Bunalara ilaveten aynı zamanda kümes ve ahırlarda sinek kontrolünde kullanıldığı da bilinmektedir (Tomlin 2006). Bu pestisit kullanılması hem hayvanları dış parazitler etkenlerden uzaklaştırılmış, hem de hayvanlarda verim artışına neden olur. Bunun nedeni pestlere bağlı olarak ortaya çıkan kayıpları ölemesi ve pestlerin taşıdığı hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkabilecek kayıpları gidermesidir. Dolayısıyla parazitlerin doğrudan etkilerinin yanında taşıdıkları hastalık etkenleri ile verdikleri zararlar da pestisitlerle azaltılır. Verim ve karlılık artar. Daha sağlıklı canlılar elde edilir.

Metomilin akut oral LD₅₀ değeri sıçanlarda 30 mg/kg olup, zehirlilik sınıfı I'dir. MRL (Maximum residue limit) değeri hıyarda 0.05, biberde 0,2 ppm, bekleme süresi hıyarda 3 gündür. Topraktaki yarılanma ömrü oldukça kısa olup (DT₅₀: 4-8 gün) (Tomlin 2006). Bu özelliklerinin tarım alanlarında uygulamalarda göz önüne alınması gerekmektedir. Özellikle toksisitesine dikkat edilmesi büyük önem arz eder.

Metomil hakkında Guanggang ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada *Drosophila* S2 HeLa ve HEK293 hücrelerinde farklı saatler aralığında verilen metomil hücrelerin yaşam sürelerini düşürmede istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir. S2 hücrelerinin 8 mM konsantrasyonunda verilen metomil $p < 0,05$ değerinde bir sonuç çıkarırken 9-9,5-9,75-10-10,5-11 mM lik konsantrasyonlarında $p < 0,001$ şeklinde istatistiksel önemde anlamlı bir tablo ortaya çıkarmıştır. HeLa hücrelerinde 12 ve 14 mM verilen metomil hücrelerin yaşam

sürelerini $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda azaltırken, 18-22-26-28-30 mM konsantrasyonlarında $p < 0,01$ düzeyinde istatistiksel önemde anlamlı olarak azaltmıştır. HEK293 hücrelerinde 6-7-8-9-9,5-10-11 mM konsantrasyonlarında verilen metomil istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı olarak azaltmıştır (Guanggang ve ark. 2013).

Yapılan başka bir çalışmada metomilin erkek sıçanlar üzerinde üreme toksisitesine bakılmıştır. Letal dozun 1/40 ve 1/20 oranlarında sıçanlara verilerek folik asitin koruyucu etkinliğini test edilmiştir. Çalışmada fertilité indeksleri, üreme organları ağırlıkları, semen resimleri ve serum testesteron seviyeleri ölçülmüştür. Metomil uygulanan dozlarda bunları belirgin ölçüde düşürmüştür. Letal dozun 1/20 oranında verilen metomil üreme indeksini % 55,56 ya düşürürken, 1/40 oranında verilen metomil üreme indeksini % 77,78'e düşürmüştür. Kontrol grubuna oral yolla distile su verilerek 9 faredeki üreme indeksi % 100 olarak bulunmuştur. Yine benzer şekilde sperm hareketliliği kontrol grubunda % 90 olurken letal dozun 1/20 oranında verilen metomil sperm hareketliliğini % 50'ye 1/40 oranında verilen metomil ise sperm hareketliliğini % 64'e düşürmüştür (Shalaby ve ark. 2010). Bu sonuçlardan doz arttıkça metomilin sperm hareketliliğini olumsuz yönde etkileyerek üreme toksisitesine neden olduğu ileri sürülebilir.

İndoksakarbin kapalı formülü $C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$ 'dir. IUPAC ismi metil 7-kloro-2,5-dihidro-2-[[methoksikarbonil] [4-(trifloromethoksi) fenil] amino] karbonil] indeno [1,2 e] [1,3,4] oksadiazin-4a(3H)-karboksilate'dır (EPA sınıfı 2'dir). (U.S. EPA 1982.).

İndoksakarb karbamat grubu bir insektisit olup, etki mekanizması onlardan biraz farklıdır. Sinir sistemindeki sodyum kanallarını bloke ederek sodyum iyonlarının girişini engellenmesine neden olur. Böceğin felç olması, beslenmesinin durması ve sonunda ölüme dayalı bir etki mekanizmasına sahiptir. İndoksakarb vücuda alındıktan sonra 0-4 saat içerisinde böcekte beslenme durur. Sonra 4-48 saat içerisinde gelişen felci ölüm izler (Lee ve ark. 2005). İndoksakarb organofosfatlar karbamatlar ve pretreoidler karşı direnç kazanmış böcekler için özellikle tercih edilir. Çevre için güvenli, hedefte olmayan organizmalar için düşük zehirli, böcekler için yüksek derecede öldürücü aktivite gibi özellikleri olduğu iddia edilmektedir. (DuPont 1999).

Bu araştırmada metomil ve indoksakarbin genotoksik etkilerinin tespit edilmesi için *mus musculus* türü swiss albino ırkifareler kullanılmıştır. Erkek ve yaklaşık 20 g ağırlığında olan farelere 14 gün süreyle distile su ile *ad libitum* olarak ilaçlar verilmiştir. İlaçların oznrlkleri de göz önüne alınarak metomilin ratlarda oral yolla ortalama letal dozunun % 10'u (3 mg/kg), indoksakarbin ratlarda oral yolla ortalama letal dozunun % 1'i (15 mg/kg) olacak şekilde seçilerek farelere uygulanmıştır. Dozlar farelere günde 2 ml su içtikleri şeklinde düşünülerek verilmiştir (doz mg/2 ml/fare).

Kemik iliğinde MN Testi ile MNPCE oranları tespit edilerek negatif ve pozitif kontrol gubuyla sonuçlar karşılaştırılmıştır. Deney sonucunda negatif kontrol grubunda ortalama MNCPE sayısı 3,6, pozitif kontrol grubunda 66, metomil verilen grupta 24,9 ve indoksakarbin verilen grupta ise 12,8 olarak tespit edilmiştir. SPSS 16 paket programı kullanılarak sonuçlar istatistiksel açıdan yorumlanmıştır. Metomil'in negatif kontrole kıyaslandığında mikronukleus sayısını belirli bir şekilde arttırmıştır. Ancak pozitif kontrol grubuna göre metomil daha düşük sayıda mikronukleus oluşumuna sebep olmuştur. Pozitif kontrol grubu uygulanan test yönteminin doğru uygulanıp uygulanmadığıının anlaşılmasında kullanılması açısında da önem arz etmektedir. Aynı şekilde indoksakarbin negatif kontrol grubuna göre mikronükleus sayısını belirgin bir şekilde arttırırken, pozitif kontrol grubuna göre daha düşük sayıda mikronükleus oluşturmuştur. Bunlar istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0,001$). Metomil verilen gruptan elde edilen sonuçlar indoksakarbin verilen gruptan elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p < 0,001$).

Bu sonuçlara göre Metomil ve İndoksakarbin'in uygulanan dozlarda genotoksite oluşturduğu söylenebilir. Bu nedenle her iki madde genotoksik etkili olma şüphesini doğurmuştur. Bu araştırma sonuçları yukarıda sıralanan çalışmaların sonuçlarıyla belirgin bir paralellik arz etmektedir. Bu da Metomil ve İndoksakarbin genotoksik etkili oldukları şüphesini kuvvetlendirmektedir. Araştırmada pozitif kontrol grubu Mitomisin C ile oluşturulmuştur. Bu pozitif kontrol grubu deney şartlarının doğrulanması açısından büyük bir anlam taşımaktadır.

Bu çalışma boyunca hiçbir hayvanda ölüm gözlenmemiştir. Sıvı tüketimleri beklenen miktarlarda olduğu günlük ölçümlerle saptanmıştır. Yine çalışmada karbamat zehirlenmelerinde görülen klinik olaylara rastlanmamış farelerin rutin davranışlarını sergilediği gözlemlenmiştir. Bu bulgular verilen dozların hayvanlarda herhangi bir zehirlenmeye neden olmadan da genotoksik etkiler doğurabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak Metomil 3mg/kg, İndoksacarb 15 mg/kg dozda içme suyuyla farelere 14 gün süreyle verildiğinde genotoksik etkilere neden olduğu ileri sürülebilir. Genotoksisitenin çevre ve canlı sağlığı açısından önemi tartışılmaz bir gerçektir. Bu nedenle elde edilen sonuçların ilaçlamalarda dikkate alınması gerektiği önem arz etmektedir. Kullanılan dozların akut zehirlenmeye neden olmayacak dozlar olduğu kalıntılarının genotoksisite açısından anlamlı olduğunu ortaya koymaktadır. Tarımda zararlılarla mücadelede bu durumun göz önüne alınmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Akan T: Organofosforlu pestisitlerin arpa bitkisi ve zebra balığı üzerindeki in vitro genotoksik etkilerinin comet testi ile araştırılması. Marmara üniversitesi fen bilimleri enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi 2012.
2. Aksu P: Akrilamidin in vivo ve in vitro genotoksitesisi üzerine fonolik bileşiklerden pelargonidin ve gallik asidin etkileri. Kafkas üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü doktora tezi; Kars. 2012.
3. Akyıl D: Bazı pestisitlerin mutajenite ve genotoksitesilerinin belirlenmesi .Afyon Kocatepe Üniversitesi Doktora Tezi .2012
4. Alaşehirli B: Kolinesteraz İnhibitörleri (Antikolinesterazlar), *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1, 47-57.2005
5. Altıntaş N, Örenay S, Aşçı, M, Reyhan, E, Türk M, Yolasığmaz A: Karaciğer kist hidatiği tedavisinde albendazol kullanan hastalarda kardeş kromatid değişimi (KKD) Çalışması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 29, 4: 235-237, 2005.
6. Amdur MO, Doull J, Klaassen C : Casarett and Doull'S Toxicology the Basic Science of Poisons 4. Baskı, unit 3, toxic effect of pestisite, 234-236, 2014.
7. Arbag H, Avunduk MC, Ozer B, Ozturk K, Ulku CH. Increased expression of epidermal growth factor receptors in the tracheal epithelia after topical mitomycin-C in rabbits. *Auris Nasus Larynx.* 32: 65-70. 2005
8. Barile FA: *Clinical Toxicology Principle and Mechanism.* Crc Press, Boca Raton, Florida, p.331-343. 2004
9. Barile FA: *Clinical Toxicology Principle and Mechanism.* Crc Press, Boca Raton, Florida, p.331-343.2004.
10. Bayrak BK: Sinir Hücrelerinde Gletim ve Bunun Öğrenme Sürecine Etkisi, Selçuk Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Dergisi, 25, 101-113. 2008
11. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA : *Neuroscience*, 3rd ed., Lippincott Williams and Wilkins, USA. 2006
12. Becalski A, Lau BP, Lewis D, Seaman SW: Acrylamide in foods; occurrence, source. Los Angeles CA. AOAC. Annual Meeting, 22-26, 2002.
13. Bolognesi C, Filiberti R, Neri M, Perrone E, Landini E, Canessa PA, Simonassi C, Cerrano PG , Mutti L , Puntomi R : High frequency of micronuclei in peripheral blood

- lymphocytes as index of susceptibility to pleural malignant mesothelioma. *J. Cancer Res.* 62: 5418-5419, 2002.
14. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L: Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an Epidemiologic Perspective. *J. Cytogenet. Genome Res.*104: 376-382, 2004.
 15. Bunin MA, Wightman RM: Paracrine Neurotransmission in the CNS: Involvement of 5-HT, *Trends in Neurosciences*, 22, 377- 382. 1999
 16. Büyükçoban T: Sağlıklı insan lenfositlerinde in vitro genotoksik analizler ve uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması Anadolu Üniversitesi fen bilimleri enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi 2010.
 17. Carbamate Pesticides: A General Introduction. *Environmental Health Criteria* 64, Geneva. immunoassays to detect N-methylcarbamate pesticides. *Anal Chim Acta*, 528:243-248.
 18. Cicchetti R. et al: *rMutation Research* 439 239–248). 1999.
 19. Cole RJ, Taylor NA, Cole J, Arlett CF: Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *J. Nature.* 277, 317-318, 1979.
 20. Cole RJ, Taylor NA, Cole J, Arlett CF: Short terms tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *J. Mutation Res.* 80, 141-157, 1981.
 21. Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, Coelho P, Gaspar J, Alves M, Laffon B, Rueff J, Mayan O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, 21(5):343-350.
 22. Çelik A, Mazmancı B, Çamlıca Y, Aşkın A, Çömelekoğlu Ü: Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *J. Mutation Res.* 539, 91-97, 2003.
 23. Çırak T: Oftalmolojik Uygulamalarda Kullanılmak Üzere Etken Madde İçeren Polimerik Süngerimsi Yapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008.
 24. Dal G.A: Mitomisin C'nin Sürekli Akış Enjeksiyon Analizi ile Miktar Tayini, Validasyonu ve Flakonlarına Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2002.
 25. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C ve Burçak A: Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre.* s. 629-648. Ankara. 2005.
 26. Doğan A, Toksikoloji, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Kars, 2012.

27. Dökmeci İ, Toksikoloji zehirlenmelerde tanı ve tedavi. Nobel tıp kitapevi. 3 baskı; İstanbul 2001, Doğan A Toksikoloji
28. DuPont™ Steward® İnsectisid Teknik Bülteni, K-04265. 1999.
29. EEC: Directive 79/831 Part B: Methods for the determination of toxicity. B.12. Other effects, Mutagenicity, Micronucleus test. 251, 137-139, 1984.
30. Elhajouji A, Tibaldi F, Volders KM: Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human Lymphocytes. J. Mutagenesis.12: 133-140, 1997.
31. Erdağı D: Malatyon verilen farelerde oksidasyon parametreleri üzerine *Allium czelghauricum* (Liliaceae), *Lathyrus karsianus* (Fabaceae) ve *Onosma nigricaula* (Boraginaceae)'den elde edilen ekstraktların etkileri. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü doktora tezi, Kars, 2012.
32. Ergene S. et al. : Environment International 33 877–885) 2007
33. Ergün S: Sjögren Sendromlu hastalarda genomik instabilitenin sitogenetik bir biomarker olan kardeş kromatid değişim sıklığı yöntemiyle araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bil. Ens. Ağız, Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.
34. Fattah A.H, Hamza A, GaafarA, Hamza M, Mourad Z. Inhalation mitomycin-C in management of laryngeal fibrosis: rationale, benefits, and pitfalls. International congress series. 1240: 831-837. 2003
35. Fenech M: Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. J.Toxicol. 181: 411-416, 2002.
36. Fenech M: The in micronucleus technique. J. Mutat. Res. 455: 81-95, 2000.
37. Fenech M: The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. J. Health Phys. 98,2: 234-243 2010.
38. Galloway SM, Miller J.E, Armstrong MJ, Bean CL, Skopek TR, Nichols WW: DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and nonDNA-reactive clastogens. J. Mutat. Res. 400,169-186, 1998.
39. Geula C, Mesulam MM : Cholinergic Systems in Alzheimer's Disease, Alzheimer Disease, 2nd ed., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292. 1999
40. Gollapudi BB, McClintock ML, Linscombe VA, Sinha AK: Evaluation of the effect of food deprivation on micronucleus test results. J. Toxicol Lett. 21, 353-356, 1984.

41. Guanggang X. et al. : Food and Chemical Toxicology 53 352–358. 2013.
42. Güngördü A: sarıyar baraj gölünde yaşayan balıklarda çevresel kirleticilerin etkilerinin belirlenmesi. İnönü Üniversitesi fen bilimleri enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 2001.
43. Harel M, Quinn DM, Haridasan KN, Silman I, Sussman JL: The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase, Journal of the American Chemical Society, 118, 2340-2346. 1996
44. Hart JW, Hartley-Asp B: Introduction of micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis. J. Mutat. Res. 120, 127-132, 1983.
45. Haynes KF: Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. Ann. Rev. Entomol. 33: 149-68. 1988.
46. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF: The induction of micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S.Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. J. Mut. Res. 123, 61-118, 1983.
47. Indian J Crit Care Med. 2008 Oct-Dec; 12(4): 198–200.
48. Ishaaya I: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. 2000.
49. İpek E, Tüylü BA, Zetinoğlu H: Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. J. Cytotechnology. 43,1-3: 145-148, 2003.
50. Jassir D, Odabaşı O, Marin OG. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency Otolaryngol Head and Neck Surg. Apr; 124(4): 368-73. 2001
51. Kaya S ve ark. Pirinçi İ ve Bilgili A: Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. İkinci Baskı. Medisan Yayınevi. Ankara. 2002.
52. Kaya S, Pirinçi İ ve Bilgili A: Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi. Birinci Baskı. Medisan Yayın Serisi: 36. Ankara. 1998.
53. Keleş O: Kanatlılarda karbamat grubu insektisitlerin kolinesteraz üzerine etkisi ve deneysel zehirlenme olaylarında oksimlerin sağıtım değerleri üzerinde araştırmalar.istanbul üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.1991
54. Kent M: Advanced Biology, Oxford University Press, England. 2000
55. Kevekordes S. et al. : 1 Toxicology Letters 89 35-42. 1996.

56. Kılınç K: Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*. X: 60-89. 1985.
57. Kirsch-Volders M , Sofuni T , Aardema M , Albertini S , Eastmond D , Fenech M, Ishidate J M , Kirchner S , Lorge, E , Morita T , Norppa H , Surrals, J , Vanhauwaert, A., Wakata, A.: Report from the in vitro micronucleus assay working group. *J. Mutat. Res.* 540, 153-163, 2003.
58. Kiss JB, Vizi ES: Nitric Oxide: A Novel Link Between Synaptic and Nonsynaptic Transmission *Trends Neuroscience, Trends in Neuro Science*, 24, 211-215. 2001
59. Klug WS, Cummings MR: *Concepts of Genetic. Genetik Kavramlar*, 6 th Edition; Çeviri Editörü Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara, Turkey, 2002.
60. Kristopher S, Silver DM. Soderlund; Action of pyrazoline-type insecticides at neuronal target sites, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81 136–143. 2005
61. Lee C and Robinson W: Metaflumizone; *Proceedings of the fifth international conference on urban pests, A New İnsecticide for Urban Insect Control rom Basf Clark, 5s.*). 2005
62. Lindholm C, Norppa H, Hayashi M, Sorsa M: Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *J. Mutat. Res.* 260: 369-375, 1991.
63. Mao Y, Varoglu M, Sherman DH. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from the *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chemistry and Biology*. 6: 251–263. 1999
64. Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA: The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *J. Mutat. Res.* 239, 29-80, 1990.
65. Mesulam, MM, Guillozet A, Shaw P, Quinn B: Widely Spread Butyrylcholinesterase can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain, *Neurobiology of Disease*, 9, 88-93. 2002
66. Mickova B, Kovalczuk T, Rauch P, Moreno MJ, Abad A, Montoya A, Ferri E, Fini F, Girotti S. (2005). Analytical performances of validated chemiluminescent enzyme immunoassays to detect N-methylcarbamate pesticides. *Anal Chim Acta*, 528:243-248.
67. Nachmansohn D, Lededer E: Chemical, Molecular Basis of Nerve Activity. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 21, 797, 1939.

68. Natarajan, AT, Obe G: Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays. In: Heddle JA(ed) Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Pres, New York, 1-213, 1982.
69. Noyan A: Fizyoloji, 8. Baskı, Meteksan Yayınları, Ankara, 1157. 1988
70. Nunes GS, Barcelo D: Analysis of carbamate insecticides in foodstuffs using chromatography and immunoassay techniques. Trends in Anal Chem, 18(2):99-107.1999.
71. OECD: Environment, health and safety publications series on testing and assessment. No. XX, draft detailed review paper on transgenic rodent mutation assays, environment directorate organisation for economic co-operation and development, Paris, 1-593, 2005.
72. OECD: Guideline for testing of chemicals. Genetic Toxicology: Micronucleus test, Document, 474, 1-6, 1983.
73. Oğuz S: Mutajenik-karsinojenik etkinin ames testi ile araştırılması. Marmara üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. 2011
74. Öncüer C ve Durmuşoğlu E: Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları No:28, 6. Baskı, Aydın, 472 s. 2008
75. Özgünen T, Evrücke C, Kadayıfçı O, Arıdoğan N: 170 Riskli Gebede Açık Nöral Tüp Defekti Taramasında Maternal Serum Alfa Fetoprotein Sonuçları, Perinatoloji Dergisi, 2, 248-250. 1994.
76. Özkaya G, Çeliker A, Koçer-Giray B. İnsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye'deki durumun değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg;70(2): 75-102.2013.
77. Pastor S et al. : Mutation Research 495. 147–156. 2001
78. Quinn, DM: Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics and Virtual Transition States, Chemical Reviews, 87, 955- 979. 1987
79. Rabbani SI, Devi K, Zahra N: Anticlastogenic effects of citral. Iranian J. Pharmacology & Therapeuticsijpt. 4, 28-31, 2005.
80. Ribas G, Syrralles J, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed in vitro. Mutat Res, 371: 15-21. 1996.
81. Rosenberry TL: Acetylcholinesterase, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 43, 103-218. 1975.

82. Rothfub A , Schütz P , Bochum S , Volm T , Eberhardt E, Kreienberg R, Vogel W.: Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *J. Cancer Res.* 60: 390-394, 2000.
83. Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, - Danadevi K, Hussain SA, Grover P. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res*, 609: 74-80. 9 2006
84. Salamone MF, Heddle JA: The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol.in: F.J. de Serres, Ed. *Chemical Mutagens*. Plenum, New York, 1983.
85. Schmid W: The micronucleus test for cytogenetic analysis. in: A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Plenum, New York, 1976.
86. Schmid W: The micronucleus test. *J. Mutat. Res.* 31: 9-15, 1975.
87. Shalaby M.A. et al. : *Food and Chemical Toxicology* 48 3221–322. 2010.
88. Shih PC ve Tsai TH: *Journal of Acute Medicine* 1 55-57. 2011.
89. Shono T,et al. : *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80 106–112. 2004
90. Silver, A: *The Biology of Cholinesterases*, American Elsevier Publishing, New York. 1974
91. Sivrikaya N: Değirmendere havzasında pestisit kirliliğinin araştırılması.karadeniz teknik üniversitesi fen bilimleri enstitüsü.Yüksek Lisans Tezi 2006.
92. Smimizu N, Shimura T, Tanaka T: Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *J. Mutat. Res.* 448: 81-90, 2000.
93. Swartz Hj : *Neurotransmitters, Principles of Neural Science*, 4th ed., McGraw-Hill Companies, US, 280-297. 2000
94. Talmi YP, Orenstein A, Wolf M, Kronenberg J. Use of mitomycin C for treatment of keloid: a preliminary report. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 132:598-601. 2005
95. Tawn E J, Whitehouse CA: Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *J. Mutat. Res.* 490: 171-177, 2001.
96. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger EK, Fenech, M: Buccal micronucleus cytome assay. *J. Nat. Protoc.* 4,6: 825-837, 2009.
97. Tiryaki O, Canhilal R ve Horuz S: Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 26(2): 154-169. Kayseri. 2010

98. Toksi G, Stankovi M, Radovanovi S, Dragi M: The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action. *J. Archi ve of Oncology*. 9: 47-48, 2001.
99. Tomlin C: *A World Compendium, The Pesticide Manual, Incorporating The Agrochemicals Handbook, Fourteenth Edition*, Ed. C. Tomlin. British Crop Publications, United Kingdom, 697-698 p 2006
100. Topaktaş M, Rencüzoğulları E.: *Sitogenetik*. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. s. 68. 1995.
101. Umegaki K, Fenech M: Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *J. Mutagenesis*, 15: 261-269, 2000.
102. Umegaki K, Fenech M: Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *J. Mutagenesis*, 15: 261-269, 2000.
103. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA); *OPP Guideline 81-1, Acute Oral Toxicity, Pesticide Assessment Guideline, Subdivision F: Hazard Evaluation; Human and Domestic Animals*, EPA Report 540/09-82-025, 1982.
104. Vanderkerken K, Vanparys P, Verschaeve L, Kirsch-Volders M: The Mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneuploids from clastogens. *J. Mutagenesis*, 4, 6-11, 1989.
105. Vijayalaxmi KK, Venu R: In-vivo anticlastogenic effects of L-Ascorbic acid in mice. *J. Mutat. Res.* 438, 47-51, 1999.
106. Vural N: *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:53. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara. 2005.
107. Wu, J, Lyons GH, Graham RD, Fenech M: The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *J. Mutat. Res.* 24,3: 225 - 232, 2009.
108. Yaren H, Kenar L, Karayılanoğlu T: *Önemli Bir Kimyasal Silah Grubu: Siner Ajanları*, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6, 491-500. 2007
109. Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S ve Aydın A: Effects of Aldicarb and Malatyon on Lipid Peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 575-581. 1999.
110. Yiğit N, Öktem AB, Aksu P: *Gıdalarda Pestisit Kalıntı Analizlerinde Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC)'nin Kullanımı*. Türkiye 10. Gıda Kongresi. Erzurum. 2008.

- 111.Yurdun T, 2007 T.C. Sağlık Bakanlığı Birinci Basamağa Yönelik Zehirlenmeler Tanı ve Tedavi Rehberleri.
- 112.Yurdun T, 2007 Hasta bina sendromu etkeni uçucu organik bileşikler ve diğer solunan kimyasallar. içinde: Hasta bina sendromu. Ed: Özyaral O, Keskin Y. Türkiye Tekstil Sanayi İşverenleri Sendikası. Tıglat Matbaacılık A.ğ., istanbul, s.283-320.
- 113.Yücer MM : Ruhsatlı Tarım İlaçları, Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 248s. 2012

5. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Iğdır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Burdur, Ağrı, Van, Kastamonu, Karabük ve Çankırı'daki çeşitli okullarda tamamladı. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni 2004 yılında kazanarak 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesinde serbest eczacı olarak işe başladı. Halen Doğubeyazıt'ta ikamet etmektedir. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde 2010 yılında yüksek lisans eğitimine başladı.