

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNSEKTİSİT FORMÜLASYONLARINDA FARKLI ORANLARDA
BULUNAN DÜŞÜRÜCÜ VE SİNERJİST ETKİLİ MADDE
KOMBİNASYONLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Havva ERTUĞRUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNSEKTİSİT FORMÜLASYONLARINDA FARKLI ORANLARDA
BULUNAN DÜŞÜRÜCÜ VE SİNERJİST ETKİLİ MADDE
KOMBİNASYONLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Havva ERTUĞRUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2019

ANTALYA

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

**İNSEKTİSİT FORMÜLASYONLARINDA FARKLI ORANLARDA
BULUNAN DÜŞÜRÜCÜ VE SİNERJİST ETKİLİ MADDE
KOMBİNASYONLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Havva ERTUĞRUL

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FLY-2017-2526 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSEKTİSİT FORMÜLASYONLARINDA FARKLI ORANLARDA
BULUNAN DÜŞÜRÜCÜ VE SİNERJİST ETKİLİ MADDE
KOMBİNASYONLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Havva ERTUĞRUL

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 11/01/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent Kaya (Danışman)

Prof. Dr. Hüseyin Çetin

Doç. Dr. Recep Liman

ÖZET

İNSEKTİSİT FORMÜLASYONLARINDA FARKLI ORANLARDA BULUNAN DÜŞÜRÜCÜ VE SİNERJİST ETKİLİ MADDE KOMBİNASYONLARININ GENOTOKSİK ETKİLERİ

Havva ERTUĞRUL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA

Ocak 2019; 152 sayfa

Dünya nüfusunun hızlı bir ivme kazanarak artması evrensel gıda ürünlerine olan talebin artmasına sebep olmakta ve beraberinde bu talebin karşılanabilmesi gerektiği için pestisit kullanımının önemli bir oranda artışına neden olmaktadır. Yeterli düzeyde ürün elde edebilmek amacıyla pestisit kullanımı her geçen gün hızla artarken beraberinde insan ve diğer canlıların, onların yaşadığı çevrenin pestisitlere maruz kalması kaçınılmazdır. Maruziyet insan ve diğer canlıların sağlığına zarar verebilecek boyutta tehdit edebilmektedir. Bu tehdidin boyutunun tespit edilebilmesi için araştırmaların yapılması büyük bir önem arz etmektedir. Pestisitlerin kullanımının canlılarda verebileceği en önemli zarar kuşkusuz genetik materyal olan DNA'da meydana gelecek hasarlardır. Genetik materyalde meydana gelebilecek hasarların tespitinde çok çeşitli model organizmalar kullanılmaktadır; ancak en yaygın model organizma ökaryotik bir model organizma olması ve çalışmaların da *in vivo* koşullarda yapılabilmesi bakımından *Drosophila melanogaster*'dir.

Bu nedenle bu tez çalışmamızda genetik yapısı bakımından büyük oranda insanlarla benzerliği bulunan ökaryotik bir model organizma olan *D. melanogaster*'de *in vivo* bir test yöntemi olan kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılarak, normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerden elde edilen 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarına, insektisit grubundan Tip I sınıfı düşürücü etkiye sahip Tetramethrin (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) ve S-bioallethrin (0.1, 0.5, 1, 5 ve 50 ppm) ile kimyasallarda sinerjist etki sağlayarak daha fazla etkili olmalarını sağlayan Piperonil bütoksit (PBO) (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) tek başına uygulamaları ve PBO + S-bioallethrin (25 ppm PBO + 0.5, 1 ve 5 ppm S-bioallethrin) ile PBO + Tetramethrin (25 ppm PBO + 3.125, 6.25 ve 12.50 ppm Tetramethrin) birlikte uygulamaları yapılarak oluşturabileceği genetik hasarlarının boyutları araştırılmıştır.

Çalışmamızda normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip *D. melanogaster* bireyleri kullanılması ile olası genetik etkilerin kimyasalın kendisinden mi yoksa parçalanma ürünlerinden mi kaynaklı olduğunun tespiti amaçlanmıştır.

Drosophila SMART yöntemi kanat imajinal disk hücrelerinde delesyon, nokta mutasyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucunda meydana gelen genetik değişimler ve bu değişimlerin fenotipte mutant trikomlar olarak gözlenebilmesi esasına dayanır. Çalışmamızda kullanılan pestisitlerin *Drosophila* larvalarının kanat imajinal disklerinde meydana getirdiği genetik değişimlerin bir sonucu olarak fenotipe yansıyan mutant trikomlarının tespiti edilmesi ile sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda; normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulanan tüm dozlarının klon frekanslarında nispeten kontrol grubuna göre istatistiki açıdan önemli olmayan azalma saptanmıştır. Normal bireylerin birlikte uygulama dozlarından 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin ve 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin dozunun klon sayısı göreceli olarak kontrol grubuna göre daha yüksek çıksada diğer taraftan birlikte uygulamaların dozlarında toplam klon sayısında bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu ortaya çıkan farklar istatistiksel olarak önemli değildir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde tek başına uygulamalarda S-bioallethrin ve Tetramethrin'in bütün dozlarının klon frekanslarında kontrol grubuna göre nispeten bir artış gözlenmiş ancak istatistiki olarak kontrol grubundan farksız olmadığı belirlenmiştir. PBO'nun tek başına uygulanan dozlarında 50 ve 100 ppm'de klon frekansını azalttığı gözlenirken 1, 5 ve 25 ppm dozlarında ise kontrol grubuna göre artış olduğu görülmesine rağmen istatistiksel önemde değildir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde birlikte uygulamalarda 25 ppm PBO + 6.25 ppm ve 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin dozunda toplam klon sayısında istatistiksel önemde olmayan bir artışla birlikte uygulanan diğer dozlarında klon frekansında kısmen bir düşüş gözlenmiştir. Elde edilen normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylere yapılan bütün uygulamalarda klon frekanslarındaki değişimlerin istatistiksel önemde olmadığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila*, Genotoksisite, Piperonil bütoksit (PBO), S-Bioallethrin, SMART, Tetramethrin.

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent Kaya

Prof. Dr. Hüseyin Çetin

Doç. Dr. Recep Liman

ABSTRACT
INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS OF REDUCTION AND
SINERGIST EFFECTIVE SUBSTANCES IN DIFFERENT RATIO IN
INSECTICES FORMULATIONS

Havva ERTUĞRUL

MSc. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

January 2019; 152 pages

The rapid growth of the world population has led to an increase in demand for universal food products, which in turn has led to a significant increase in the use of pesticides as this demand must be met. While the use of pesticides is increasing day by day in order to obtain a sufficient level of product, it is inevitable that people and other living beings are exposed to the pesticides of the people they live in. Exposure is a threat to the health of people and other living things. It is of great importance to carry out investigations in order to determine the size of this threat. The most important damage that the use of pesticides can give to living organisms is, of course, damage to genetic material DNA. A wide variety of model organisms are used in the detection of damages that can occur in genetic material, but *Drosophila melanogaster* is the most common model organism in that it is a eukaryotic model organism and that studies can be carried out *in vivo*.

Therefore, in this thesis study, we investigated the relationship between the genetic structure and the metabolic activity of individuals with normal and high metabolic activity, using the *in vivo* somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster*, an eukaryotic model organism similar to humans Tetramethrin (1, 5, 25, 50 and 100 ppm) and S-bioallethrin (0.1, 0.5, 1, 5, and 50 ppm) with insecticide group type I lowering effect on the 72 ± 4 hour transheterozygous larvae PBO + S-bioallethrin (25 ppm PBO + 0.5, 1 and 5 ppm S-bioallethrin) and PBO + Tetramethrin (1, 5, 25, 50 and 100 ppm) alone and Piperonyl butoxide 25 ppm PBO + 3.125, 6.25 and 12.50 ppm Tetramethrin) were investigated to determine the extent of the genetic damage they could produce.

In our study, it was aimed to determine whether the genetic influences were caused by the chemical or the degradation products by using *D.melanogaster* individuals with normal and high metabolic activity.

The *Drosophila* smart method is based on the deletion of the wing image disk cells, genetic mutations due to point mutation and recombination, and the fact that these changes can be observed as phenotypic mutant trichomes. As a result of the genetic changes caused by *Drosophila* larvae in the wing image of the pesticides used in our study, the results were evaluated by detecting the mutant trichomes reflected in the phenotype.

As a result of this study; In the individuals with normal metabolic activity, the clone frequencies of all doses of Tetramethrin, S-bioallethrin and PBO alone were found to be not statistically significant compared to the control group. Although 25 ppm PBO + 6.25 ppm and 25 ppm + 12.50 ppm Tetramethrin dose were higher than the control group, the total clone number was decreased in the doses of co-administration on the other hand. However, these differences are not statistically significant. In individual patients with high metabolic activity, clones frequencies of all doses of S-bioallethrin and Tetramethrin were found to be relatively higher than the control group, but it was not statistically different from the control group. PBO alone reduced the clone frequency at 50 and 100 ppm at the doses administered alone, but at 1, 5 and 25 ppm, it was seen that there was an increase in the frequency of the clones compared to the control group, but not statistically. In combination with a high metabolic activity, 25 ppm PBO + 6.25 ppm and 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin in combination with a statistically insignificant increase in total number of clones showed a decrease in clone frequency. It was determined that the changes in clone frequencies were not statistically significant in all the applications made to individuals with normal and high metabolic activity.

KEYWORDS: *Drosophila*, Genotoxicity, Piperonyl Butoxide (PBO), S-Bioallethrin, SMART, Tetramethrin.

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent Kaya

Prof. Dr. Hüseyin Çetin

Doç. Dr. Recep Liman

ÖNSÖZ

Tarımsal ürünlere olan ihtiyacın artışına paralel olarak modern tarımın vazgeçilmez bir unsuru olan pestisitlerin kullanımı her geçen yıl hızlı bir şekilde yükselişe geçerken beraberinde çevre, diğer canlılar ve insan sağlığını tehdit edebilecek muhtemel toksik etkiler ve bunların tehlikesinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalar henüz yeterli bir düzeyde değildir.

Dünyada verimli tarım arazileri, endüstri ve teknolojinin gelişmesi sonucu kentleşme, deprem, erozyon vb. gibi nedenlerle kaybedilmektedir. Ayrıca yenilenemez doğal kaynaklardan olan tarım alanlarının günümüz şartlarında genişletilmesinin zor ve maliyetli olması nedeniyle pek mümkün olmadığı görülmektedir. Bu durum sonucunda mevcut olan birim alanda üretilen üründen maksimum kalitede ve yüksek miktarda elde edebilmek için pestisit kullanımı kaçınılmazdır.

Pestisit kullanımı sonrası canlıların direnç mekanizması geliştirdikleri göz önünde bulundurulduğunda, oluşan direncin kırılabilmesi için her yıl yüzlerce yeni pestisit formülasyonlarının oluşturulması gerekmektedir. Bu bağlamda üretilen her yeni pestisit toksisitesinin belirlenmesinde, vücuda giriş yolları, vücutta tutuldukları süre, vücuda giren doz miktarının hücrelerde ve organlardaki etki mekanizmaları kapsamında canlılar ve insan sağlığına verdiği toksik etkilerin boyutlarının anlaşılabilmesi adına kullanılan kimyasalların yapılarının iyi karakterize edilmesi büyük bir önem taşımaktadır.

Pestisitler canlı vücuduna deri, solunum ve beslenme yoluyla alınarak hücre, doku, organ ve vücut sıvılarına zararlar vermekte ve bu zararlardan en önemli olanı genetik materyal üzerinde yaptığı hasarlardır. Genetik materyalde oluşan bir hasarın nesiller boyunca aktarılacağı göz önüne alınırsa pestisit toksisitesinin araştırmalardaki önem derecesi katlanarak artmaktadır.

Bu çalışma kapsamında canlıların çeşitli yollarla bünyelerine aldıkları farklı formülasyonlardaki insektisit kimyasallarının genotoksisitelerinin aydınlatılarak açıklığa kavuşturulmasında, ökoryatik bir canlı organizma olan *Drosophila melanogaster* ve *in vivo* test sistemi olan *Drosophila* SMART yönteminin kullanılarak tespit edilmesi büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler ile çalışılmış olması, canlı bünyesine alınan kimyasalın kendisinin mi yoksa parçalanma sonucu oluşan ürünlerin mi daha toksik etkiye sahip olduğu hakkında bilgi vermesi açısından değerlidir.

Bu yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarında pestisit toksisitesi hakkında literatürde bir yer edinerek, yapılacak olan yeni araştırmalarda bir ön adımı teşkil etmesini ve yeni çalışmalarda bilgilere ulaşma aşamasında ışık tutmasını temenni ederim.

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın araştırılma, planlanma ve yürütülmesi aşamalarında ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Bülent KAYA'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: FLY-2017-2526), Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans ve Doktora programında bulunan değerli arkadaşlarıma ve her koşulda yanımda olan her zaman desteğini hissettiğim kıymetli aileme ve sevgili dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Pestisitlerin Tanımı.....	3
2.2. Pestisitlerin Tarihçesi.....	3
2.3. Pestisitlere Maruz Kalmanın Yolları.....	4
2.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	5
2.4.1. Etkiledikleri canlı türlerine ve kullanım alanlarına göre sınıflandırma.....	8
2.4.1.1. İnsektisitler.....	8
2.4.1.2. Herbisitler.....	8
2.4.1.3. Fungusitler.....	8
2.4.1.4. Akarasitler.....	8
2.4.2. Kimyasal yapılarına göre pestisitlerin sınıflandırması.....	8
2.4.2.1. Organo fosfat pestisitler.....	8
2.4.2.2. Karbamil grubu pestisitler.....	9
2.4.2.3. Organa klorür pestisitler.....	9
2.4.2.4. Piretroid pestisitler.....	9
2.5. Pestisitlerin Çevreye Olan Etkileri.....	10
2.6. Türkiye Pestisit Kullanımı.....	10
2.7. Dünyada Pestisit Kullanımı.....	12
2.8. Pestisitler.....	12
2.9. Pestisit Toksisitesi.....	14
2.9.1. Parkinson.....	14
2.9.2. Alzheimer.....	15

2.9.3. Diabet.....	16
2.9.4. Kanser.....	17
2.9.5. Genetik hasar.....	17
2.10. Piretroidler.....	19
2.11. S-Bioallethrin.....	24
2.11.1. Moleküler formülü.....	24
2.11.2. Kimyasal adı	24
2.11.3. Kimyasal yapı	24
2.12. S-Bioallethrin Toksisitesi.....	25
2.13. Tetramethrin.....	28
2.13.1. Moleküler formülü.....	28
2.13.2. Kimyasal adı	28
2.13.3. Kimyasal yapı	28
2.14. Tetramethrin Toksisitesi.....	29
2.15. Piperonil Bütoksit (PBO).....	34
2.15.1. Moleküler formülü.....	34
2.15.2. Kimyasal adı	34
2.15.3. Kimyasal yapı	34
2.16. PBO Toksisitesi.....	35
2.17. Genetik Toksikoloji ve Genotoksikoloji Testleri.....	38
2.17.1. Ames (<i>Salmonella</i> /Mikrozom Mutajenite) Testi.....	39
2.17.2. Mikronükleus (MN) Testi.....	39
2.17.3. Comet Testi (Single cell gel electrophoresis).....	40
2.17.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi.....	40
2.17.5. Kromozom Anormallikleri (KA) Testi.....	41
2.18. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)	41
2.19. <i>Drosophila melanogaster</i>	42
2.20. Normal ve Yüksek Metabolik Aktiviteye Sahip <i>Drosophila melanogaster</i>	44
2.21. Ksenobiyotik ve Biyotransformasyon.....	45
3. MATERYAL VE METOT.....	47
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü.....	47

3.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> in evreleri.....	50
3.1.1.1. Yumurta evresi.....	50
3.1.1.2. Larva evresi.....	51
3.1.1.3. Pupa evresi.....	51
3.1.1.4. Yetişkin evresi.....	52
3.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı.....	54
3.3. <i>Drosophila melanogaster</i> Hatlarının Kültürü.....	60
3.4. Trans Heterozigot Larvaların Elde Edilmesi.....	63
3.5. Deney Grupları.....	63
3.6. Kimyasal Uygulamaları.....	65
3.7. Kanat Preparatlarının Hazırlanması.....	68
3.8. Kanat Preparatlarının Mikroskop İle Analizi.....	69
3.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması.....	74
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi.....	74
4. BULGULAR.....	76
4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Kullanılarak İnsektisitlerin Genotoksikolojik Etkilerinin Belirlenmesi.....	76
4.1.1. Normal metabolik aktiviteye sahip bireyler.....	77
4.1.1.1. Negatif ve pozitif kontrol grupları.....	77
4.1.1.2. Tetramethrin tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	77
4.1.1.3. S-Bioallethrin tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	78
4.1.1.4. Piperonil Bütoksit (PBO)'nun tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	78
4.1.1.5. Tetramethrin ve Piperonil Bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	81
4.1.1.6. S-Bioallethrin ve Piperonil Bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	81

4.1.2. Yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireyler.....	84
4.1.2.1. Negatif ve pozitif kontrol grupları.....	84
4.1.2.2. Tetramethrin tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	84
4.1.2.3. S-Bioallethrin tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	85
4.1.2.4. Piperonil Bütoksit (PBO)'nun tek başına uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	85
4.1.2.5. Tetramethrin ve Piperonil Bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	88
4.1.2.6. S-Bioallethrin ve Piperonil Bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının <i>Drosophila melanogaster</i> 'de genotoksik etkileri.....	88
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇLAR	104
7. KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İnsektisit Formülasyonlarında Farklı Oranlarda Bulunan Düşürücü ve Sinerjist Etkili Madde Kombinasyonlarının Genotoksik Etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/01/ 2019

Havva ERTUĞRUL

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Bd^S	: Beaded Serrate
flr^3	: Flare
gr	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mwh	: Multiple wing hair
ppm	: Parts per million
°C	: Santigrat

Kısaltmalar

DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMS	: Etil Metan Sülfat
KOMET	: Tek Hücre Jel Elektroforoz Testi
LC ₅₀	: Öldürücü konsantrasyon
OC	: Orgonoklorür
OP	: Orgonofosfor
PBO	: Piperonil Bütoksit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
SP	: Sentetik Piretroid
NMA	: Normal metabolik aktiviteye sahip bireyler
YMA	: Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Yıllara göre pestisit tüketim miktarı	11
Şekil 2.2. Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı.....	11
Şekil 2.3. Pestisit gruplarına göre Dünya’da tarım ilacı kullanımı	12
Şekil 2.4. Zirai ilaçların toksisiteleri hakkında kanıtların ağırlığını gösteren şematik diyagram.....	14
Şekil 2.5. Pestisitlerin neden olduğu mitokondri hasarı.....	15
Şekil 2.6. Nöronal apoptozun ayrıntılı mekanizması	16
Şekil 2.7. Genetik hasarın oluşumu.....	18
Şekil 2.8. Piretrin I ve II açık formülü	20
Şekil 2.9. 1990'dan 2013'e kadar Dünya çapında yıllık piretroid aktif bileşen kullanımı.....	22
Şekil 2.10. S-bioallethrin kimyasal yapısı ve 8 stero izomer görüntüsü	24
Şekil 2.11. Tetramethrin kimyasal yapı ve 4 stero izomer görüntüsü.....	28
Şekil 2.12. Piperonil bütoksit (PBO) kimyasal yapısı.....	34
Şekil 2.13. <i>Drosophila melanogaster</i> ’in hastalık araştırmalarında kullanılması.....	43
Şekil 3.1. <i>Drosophila melanogaster</i> ’ in yaşam döngüsü.....	48
Şekil 3.2. <i>Drosophila melanogaster</i> ’de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi.....	49
Şekil 3.3. <i>Drosophila melanogaster</i> yumurta görüntüsü.....	50
Şekil 3.4. <i>Drosophila melanogaster</i> larvasının görüntüsü; a) Larva; b) Larvanın ağız ve abdomen kısmının büyütülmüş görüntüsü.....	51
Şekil 3.5. <i>Drosophila melanogaster</i> pupa evresi görüntüsü ; a) Pupa; b) Pupanın ağız ve abdomen kısmının yakın görüntüsü	51
Şekil 3.6. <i>Drosophila melanogaster</i> larvalarında bulunan imajinal disk hücrelerinin erişkinde bireylerinde karşılık geldiği bölgelerin yerleri.....	52
Şekil 3.7. <i>Drosophila melanogaster</i> kıvrık ve normal kanat görünümü.....	53
Şekil 3.8. <i>Drosophila melanogaster</i> erkek ve dişi ergin birey görüntüsü.....	53
Şekil 3.9. <i>flr³/TM3</i> , <i>Bd^S</i> bireyleri arasındaki çaprazlama sonucu homozigot ve heterozigot bireylerin elde edilmesi ile <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr³/TM3</i> , <i>Bd^S</i> bireyleri arasındaki çaprazlama sonucu dengelenmiş heterozigot <i>mwh/Bd^S</i> ve transheterozigot <i>mwh/flr³</i> bireylerin elde edilmesi.....	55
Şekil 3.10. <i>Drosophila melanogaster</i> serrat ve normal kanat görünümü	56

Şekil 3.11. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri	57
Şekil 3.12. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne <i>flr³</i> ne de <i>mwh</i> olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) <i>mwh</i> trikomlar d) <i>flr³</i> genotipe ait trikomlar	58
Şekil 3.13. Farklı genotoksik olayların sonucu oluşan genetik anomaliler ve fenotipe yansıyan tek tip ve ikiz klon görünümüler	59
Şekil 3.14. <i>Drosophila</i> besini a) Hazırlanmış besin; b) Virjin dişilerin bulunduğu besin kavanozları; c) Besinde larvalar; d) Kültürün çoğaltılması	61
Şekil 3.15. <i>Drosophila</i> kültür odası	62
Şekil 3.16. <i>Drosophila</i> SMAR testi için farklı kimyasal uygulama zamanlamaları	65
Şekil 3.17. Kimyasal uygulaması yapılmış uygulama tüpleri	67
Şekil 3.18. Kanat preparatları	68
Şekil 3.19. Kanat sektörlerinin şematik görünümü	70
Şekil 3.20. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü	72
Şekil 3.21. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü	72
Şekil 3.22. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klonların görünümü	73
Şekil 3.23. İkiz mutant klonların görünümü	73
Şekil 4. 1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği	80
Şekil 4. 2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği	83
Şekil 4.3. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği	87
Şekil 4.4. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	6
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	64
Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	75
Çizelge 4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri.....	79
Çizelge 4.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri	82
Çizelge 4.3. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri	86
Çizelge 4.4. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (<i>mhw/flr³</i>) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri	89

1. GİRİŞ

Canlılar enerji üretme, bölünme, tamir ve birçok biyokimyasal olayları gerçekleştirebilmek için besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Canlılık için besin olmazsa olmaz unsurlardan biridir. Bütün canlılar su ve besin olmadan hayatta kalamazlar. Bu bağlamda besin ihtiyaçlarını karşılamak canlılar için hayati bir önem taşır. Canlıların bulunduğu ortamda yeterli düzeyde besinin temini için farklı amaçlarla bazı kimyasallar kullanılmaktadır.

Tarım ürünlerine üretim, hasat, depolama ve taşıma esnasında zarar veren herhangi bir zararlıyı (yabancı otlar dâhil) kontrol etmek veya bunların zararlarını önlemek amacıyla uygulanan, herhangi bir böcek veya zararlının kontrolü amacı ile verilen kimyasal madde veya maddeler karışımı olup, bunlardan yapılan mamüllere de pestisit veya tarım ilacı denir (FAO 2002).

Bilim ve teknolojinin gelişmesi beraberinde paralel olarak endüstrisinde büyümesine neden olmaktadır. Dünya nüfusunun her geçen gün hızlı bir şekilde büyüdüğü göz önünde bulundurulursa yeni gereksinimler devamlı artacaktır. Bu ihtiyaçları karşılamak için gelişen teknolojinin sağladığı faydalar büyük bir öneme sahipken aynı zamanda insan ve çevre üzerinde istemeden de olsa zararlı etkilere yol açmaktadır.

Dünya’da her geçen gün nüfusun hızlı bir ivme kazanarak artması ancak nüfus artışına paralel olarak verimli tarım toprakların her geçen gün küçülmesi mevcut topraklardan elde edilen ürünün daha fazla olmasını gerektirmektedir. Birim alandan elde edilecek ürünlerin kaliteli ve verimli olması için pestisitlerin kullanımı mecburiyet halini almıştır. Bu nedenle yiyeceklerimizin üretiminde ve korumasında çok fazla pestisit kullanılmaktadır. Pestisitlerden maksimum etkinlik elde etmek için kombinasyonların kullanımı yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu durumda böcek ilacı etkileşim mekanizmaları ve yararları ile riskleri hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamız gerekmektedir. Kullanılan pestisit miktarı göz önüne alındığında konunun ne kadar önemli olduğu da görülmektedir, bu yüzden birçok bilim insanının birlikte yapacağı çalışmalarla konunun aydınlatılması, insan ve çevre sağlığında oluşturabileceği zararı minimum seviyede olacak şekilde olmasını sağlamak adına önemlidir.

Piretroidler, Dünya çapında hem kırsal hem de kentsel alanlarda yaygın olarak kullanılan düşük memeli toksisitesi olan sentetik organik böcek öldürücülerdir. Doğal çevreye girdikten sonra, piretroidler katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç faz arasında dolaşır ve gıda zincirleri yoluyla organizmalara girerek ciddi sağlık risklerine yol açar. Mesleki kullanımlar, tarımsal faaliyete konut yakınlığı, ev uygulamaları, beslenme ve kirlenmiş yüzeylerle dermal temas da maruziyet seviyelerine katkıda bulunabilir (Tang vd. 2018).

Beslenme direk kontamine olmuş besinle olabileceği gibi bazı pestisitlerin canlı vücudunda kalıcı olarak depo edildiği düşünülürse besin zinciri vasıtasıyla da gerçekleşmektedir.

Pestisitlerin canlılara verdiği en önemli zararlardan biride genetik materyal olan DNA'da yol açtığı hasarlardır ve bu hasarların verdiği etkiler ile oluşan mutasyonlar sonucunda zararların geri dönüşümünün olmadığı ve nesilden nesile aktarımı düşünülürse konunun önemi daha da net anlaşılmaktadır. Pestisitlerin kullanımı sonucunda oluşturabileceği genetik hasarların saptanabilmesi için farklı test yöntemleri kullanılarak araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada, piretroid pestisitlerinden Tip I sınıfı Tetramethrin ve S-Bioallethrin ile sinerjist PBO'nun oluşturabileceği genotoksik etkileri ökaryotik bir canlı olan *Drosophila melanogaster*'de *in vivo* test yöntemi olan *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Pestisitlerin Tanımı

Pestisit kelime anlamı, pest (zararlı), cide (öldürücü) olmak üzere zararlıları öldürücü anlamına gelmektedir. Bugün yurdumuzda ve Dünya'da ürün artışıını sağlayabilmek için böcek, bakteri, fungus ve yabani ot vb. çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" adı verilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Pestisitler, kültürü yapılan ürünler ve zararlı organizmaları öldürmek için bilinçli olarak ortama atılan maddedir (DPT 2008; Kubilay 2013).

Tarımda farklı kimyasal bileşikler kullanılarak zararlıların etkisiz hale getirilmesine “kimyasal mücadele” denir. Pestisitler etkinliklerinin artırılması amacıyla iki veya daha fazla kimyasal maddenin belli oranlarda karışımı şeklinde kullanılmaktadır. Yüksek toksik özellikleri zararlılarla mücadelede etkili ve hızlı sonuç almayı sağlasa da insan ve çevre için olumsuz yan etkilerinin olmasıda muhtemel bir sorundur. Çevre ve insan sağlığına zararlı etkisini azaltmak, ekonomik açıdan yarar sağlamak için pestisitlerin yardımcı maddeler ve dolgu maddeleri ile karıştırılmak suretiyle kullanımları daha uygundur. Kimyasalların fiziksel olarak karıştırılmasına “formülasyon (ilaç)” denir. Formülasyon oluşturulurken belirli oranlarda karıştırılan pestisitlere “etken madde veya aktif madde” denilmektedir. Etken madde pestisit içindeki etkili olan kimyasal ve öldürücü özellikte bulunandır. Formülasyonlar farklı oranlarda karışımlar yapılarak elde edilebilir (DPT 2008; Kubilay 2013).

Bir formülasyonda etkili veya aktif madde, dolgu maddesi, emülgatör ve daha başka kullanıma uygun yardımcı maddeler yer alabilmektedir. Bu maddelerin karışımların belirli esaslara göre yapılması için FAO ve WHO tarafından standart metotlar getirilmiştir (DPT 2008; Kubilay 2013).

2.2. Pestisitlerin Tarihçesi

Pestisitler, antik çağlardan bu yana sınırlı sayıda bir dereceye kadar kullanılmışlardır. İlk bildirilen bileşik Sümerliler tarafından 4500 yıl önce böcek ve akarları öldürmek için kullanılan kükürt bazlı bileşiklerdir. 15. yüzyılda, Çin’de bahçe böceklerini kontrol etmek için civa ve arsenik kullanılmaya başlanılmıştır. 17. yüzyılda zararlılarla mücadelede öldürücü olarak tütün kullanımı popülerlik kazanmıştır. 17. yüzyılda henüz kimyasal endüstrinin kuruluşu tam gelişmediği için bitki ve hayvan kaynaklı ürünlerin kullanımı daha fazla ve kolay olduğu için tercih edilmiştir. 18. yüzyılın sonlarına doğru ve 19. yüzyılın başlarında sadece birkaç kimyasal bileşik bulunmakta ve bunların kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır (IARC 1991).

C. cinerariaefolium “Piretrum papatyaları”nın kurutulmuş çiçeklerinden elde edilen Piretrum, 2000 yılı aşkın bir süredir insektisit olarak kullanılmaktadır.1870'ten başlayarak, piretrumların kullanımı ile pestisitler için mevcut bileşik sayısı giderek

artmıştır. 20. yüzyılda, İkinci Dünya savaşı sırasında birçok bilim insanı böcek ilaçlarını oluşturan bileşenlerden biyolojik silah üretme çabasına yöneltmiştir. Bu durum sentetik böcek ilaçlarının üretimine yol açmıştır. Sentetik pestisitlerin gelişmesi 1940'larda DDT (Dikloro difenil trikloroetan), BHC (β -Benzen heksaklorür), aldrin, dieldrin, endrin, klordan, parathion, kaptan ve 2,4-D'nin insektisit özelliklerinin keşfi ile hız kazanmıştır (George ve Shukla 2011).

DDT'ler geniş spektrum aktivitesi ve memelilere karşı düşük toksisitesi nedeniyle sıtma, sarıhumma ve tifüs gibi böcek kaynaklı hastalıkların azaltılmasında etkili olduğu için çok popüler hale gelmiştir (George ve Shukla 2011). Ancak 1946'da ev sineklerinde DDT'ye karşı direncin gelişmesi ve yaygın kullanımı nedeniyle hedefe yönelik olmayan bitki ve hayvanlara zarar verdiği bildirilmiştir ve bu nedenlerle kullanımı yasaklanmıştır. 1990'larda araştırma faaliyetleri, daha fazla seçicilik ve daha iyi çevresel ve toksikolojik profillere sahip olan mevcut pestisitlere yeni üyeler bulmaya odaklanmıştır. Bu amaçla daha düşük dozlarda daha etkili pestisitlerin geliştirilmesi için çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu geliştirilen yeni pestisitlerin çoğunun hektar başına kilogramdan ziyade gram olarak kullanılabilmesi nedeni ile maruziyet oranı da azalmıştır (George ve Shukla 2011).

2.3. Pestisitlere Maruz Kalmanın Yolları

Pestisitlere maruz kalmak doğrudan doğruya bitkisel, tarımsal ve evsel kullanımdan kaynaklanabildiği gibi dolaylı yollarla da, genel nüfusun yaşam alanı içerisinde bulunan anayollar, park, bahçe, sahalar vb. yerlere uygulanan pestisitler nedeniyle de kaynaklanmaktadır. Pestisitlere insan maruziyetinin ana yolları besin zinciri, hava, su, toprak ve buralarda bulunan flora ve fauna aracılığı ile olmaktadır (Anderson ve Meade 2014; Kim vd. 2017).

Pestisitlere insanların maruziyetleri, deri, göz, ağız ve solunum yolları gibi dört farklı yoldan olmaktadır. Pestisitlerin toksisitesi, deri, ağız veya solunum yolu (soluma) gibi maruz kalma türlerine bağlı olarak değişebilir. Genel olarak bekleneneği gibi pestisit kontaminasyonu tehlikesi genellikle ilgili kimyasalın toksisitesine ek olarak dozajına (konsantrasyon) göre de artmaktadır (Meenakshi vd. 2012).

Pestisit uygulayıcılarının maruz kaldığı en yaygın ve etkili yollardan birisi dermal maruziyettir (Anderson ve Meade 2014). Pestisitlerin karıştırılması, yüklenmesi, bertarafı veya temizlenmesi sırasında bir sıçrama, dökülme ya da sprey sürüklenmesinin bir sonucu olarak dermal emilim meydana gelebilir (Salvatore vd. 2008). Bir pestisite ancak ağız yolu ile maruz kalındığı zaman şiddetli zehirlenme ortaya çıkar. Ağız yolu ile meydana gelen pestisit maruziyeti genellikle dikkatsizliğe veya kasıtlı sebeplere bağlı olarak kaza sonucu ortaya çıkar (Damalas ve Eleftherohorinos 2011).

En sık rastlanan maruziyet nedeni pestisitlerin orijinal etiketli kaplarından etiketlenmemiş bir şişeye veya gıda kabına aktarılması durumunda meydana geldiği

bildirilmiştir (Gilden vd. 2010). Ayrıca pestisit uygulayıcılarının yemek yemeden ve sigara içmeden önce ellerini yıkamamaları sonucunda ağız yolu maruziyeti gerçekleşmektedir (ABD Çevre Koruma Kurumu, USEPA 2007). Bunun yanında pestisitlerin uçucu bileşenlerinin varlığından dolayı, solunum yolundan maruz kalma potansiyelleri yüksektir (Amaral 2014). Çok miktarda pestisit solunması burun, boğaz ve akciğer dokularında ciddi hasara neden olabilir (Damalas ve Eleftherohorinos 2011). Bir pestisite göz yolu ile maruziyet oldukça önemlidir çünkü pestisitlerin uygulanması sırasında kimyasal yaralanma potansiyeli en yüksek olan göz dokularıdır. Bazı pestisitlerin göz tarafından yeterli miktarlarda emildiği zaman ciddi ve hatta ölümcül bir hastalığa neden olabildiği bildirilmiştir (Gilden vd. 2010).

Kimyasal maddenin toksik dozuna bir kere veya kısa zaman (24 saat) içinde birçok kere maruz kalma sonucu akut etki görülür (Loomis 1978). Piretroidler akut dozlarda toksisiteye neden olsa da, düşük seviyelerin memeli siniri içinde herhangi bir zararlı histolojik değişikliğe neden olduğu gözlenmemiştir (Parker vd. 1985). Belirli zaman periyotlarında kimyasalların küçük dozlarına tekrar tekrar maruz kalmanın sonucunda ortaya çıkan etkilere kronik etki denilmektedir (Loomis 1978). Belirli bazı pestisitlerin şüpheli kronik etkileri ise doğum anormallikleri, fetal toksisiteye, tümör oluşumu, genetik değişiklikler, hematolojik ve nörolojik bozukluklar şeklinde görülebilir (Ames 1989).

2.4. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler profesyonel kullanıcıların yanında normal toplum bireylerinde kullanabilmesi için küçük paketler halinde sunulmaktadır. Pestisitlerin başlıca kullanım alanları; tarımsal üretim, bahçecilik, balık yetiştiriciliği, ormancılık, süs amaçlı bölgelerde (parklar, bahçeler, oyun alanları), tütsüleme ve kereste korumacılığı, endüstriyel böcek kontrolü, inşaat (duvar kâğıdı yapıştırıcıları, boyalar, sıvacılık vb.), ev ve bahçelerde, deniz ve sucul böcek kontrolü, gıda saklanması, hayvancılık, toplum hijyeni, böcek kontrolü, beşeri ilaç vb. olmak üzere birçok alanı kapsamaktadır (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Pestisitlerin geniş bir yelpazede yaygın olarak kullanılmasının yanında en fazla kullanıldığı alanın tarım alanı olduğu düşünüldüğünde sağlıklı, kaliteli ve sürdürülebilir bir tarım için doğru ve güvenilir bir bilgi ile pestisitlerin sınıflandırılması gerekli ve önemlidir (Tisit 2018) (Çizelge 2.1). Pestisitler kimyasal sınıflar, fonksiyonel gruplar, etki tarzı ve toksisite gibi çeşitli kriterlere göre çok farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Garcia vd. 2012). Pestisitler hedeflenen organizma temel alınarak insektisitler, fungusitler, herbisitler vb. ayrıca organofosfatlar, organoklorinler, karbamatlar ve piretroidler olarak formülasyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (Asghar vd. 2016).

Çizelge 2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması (Tisit 2018'den uyarlanmıştır)

I. FORMÜLASYON ŞEKİLLERİNE GÖRE	II. ETKİLEDİKLERİ ZARARLI GRUPLARINA GÖRE	IV. ETKİLEDİĞİ ZARARLININ BİYOLOJİK DÖNEMİNE GÖRE	VI. TOKSİK ÖZELLİKLERİNE GÖRE	IX. ETKİ ŞEKİLLERİNE GÖRE PESTİSİTLERİN SINIFLANDIRILMASI
1- Toz İlaçlar	1-İnsektisitler	1-Larvasitler	1-Fiziksel Zehirler	1-Asetilkolinesteraz (Kolinesteraz) İn.
2-İslanabilir Toz İlaçlar	2-Akarasitler	2-Ovisitler	2-Protoplasma Zehirleri	2-Kitin Sentezi İnhibitörleri
3-Suda Çözünen Toz İlaçlar	3-Nematisitler	3-Ovalarvasitler	3-Sinir Sistem Zehirleri	3-Ekdizon Agonisti
4-Kuru Tohum İlaçlar	4-Mollusisitler	4-Erginleri Öldürenler	4-Solunum Zehirleri	4-GABA Bloklayıcı (Amino Bütirik Asit İnhibitörü)
5- Solüsyonlar veya Sulu Çözeltiler	5-Rodentisitler		5-Antiguagulantlar	5-Jüvenil Hormon Analogu (Böcek Büyüme Regülatörleri)
6-Emülsiyon Konsantre İlaçlar	6-Avisitler	V.ZARARLILARA ETKİ YOLLARINA GÖRE		6-Antikoagülant
7-Akıcı Konsantre İlaçlar	7-Afisitler	Organizmaya Girmesi	VII. KONTROL ETTİĞİ ZARARLILARIN BULUNDUĞU YERE KONAKÇIYA GÖRE	7-Glutamin Sentetaz İnhibitörü
8-Yağlar	8-Fungusitler	1-Mide Zehirleri	1-Kültür Bitkilerindeki Zararlılara Karşı Kullanılanlar	8-Steroid Demetilasyon (Ergosterol Biyosentezi) İnhibitörü
9-Tabletler	9-Fungustatikler	2-Değme Temas Zehirleri	2-Orman Zararlılarına Karşı Kul.	9-Protoporfirinojen Oksidaz İnhibitörü
10-Granüller	10-Herbisitler	3-Solunum Zehirleri	3-Kerestelerin Korunmasında Kul.	10-RNA-Polimeraz İnhibitörü
11-Pelletler	11-Bakterisitler	Bitkilerde	4-Depodaki Ürüne Zarar Verenlere Karşı Kullanılanlar	11-Protein Sentezi İnhibitörü
12-Aerosoller	12-Algisitler	1-Sistemikler	5-Ev Böceklerine Karşı Kullanılan	12-Fotosentetik Elektron Taşıma İnhibitörü
13-Zehirli Yemler	13-Kaçıncılar	2-Yarı Sistemikler	6-Hastalık Vektörlerine Karşı Kul.	13-Tiyol Reaktantı
14-Kapsül Şekli Verilmiş Formülasyonlar	14-Çekiciler	3-Sistemik Olmayanlar	7-Hayvan ve İnsanlardaki Dış Parazitlere Karşı Kullanılanlar	14-Mitokondriyal Solunum İnhibitörü
15-Gübre Karışımları				
16-Yağ Konsantreleri ve Yağ Solüsyonları	III. KULLANMA TEKNİĞİNE GÖRE		VIII. İLACIN FİZİKİ HALİNE GÖRE	
17-Çok Düşük Hacimli Sulandırılmadan Kullanılan Sıvı İlaç Formülleri	1.Dogrudan Kullanılan İlaçlar, Toz İlaçlar		1-Katı Formülasyonlar	
18-Gaz Halinde Olanlar	2-Su veya Organik Çözücü İle Seyreltilen İlaçlar		2-Likit Formülasyonlar	
19-Diğerleri				

Çizelge 2.1. Pestisitlerin sınıflandırılması (Tisit 2018'den uyarlanmıştır) (Çizelge 2.1 devamı)

X. BİLEŞİMİNDEKİ ETKİLİ MADDE GRUBUNA GÖRE			
1-İNSEKTİSİTLER	3-AKARİSİTLER	7-FUNGİSİTLER	8-BİTKİ KORUMADA KULLANILAN DİĞER MADDELER
Klorlandırılmış Hidrokarbonlar	Halojen ve Oksijenliler	A-Koruyucu fungusitler	Demirli Bileşikler
Organik Fosforlar	Amin ve Hidrazin Türevleri	Bakırlar	Böcek Cezp Ediciler
Karbamatlar	Dinitrojenal ve Esterler	Dicarboximitler-phytalinidler	Fremonlar
Sentetik Piretroitler	Kükürtler	Dithiocarbamatlar	Bitki Gelişim Düzenleyiciler
Benzoyl Üreler	Organik Kalaylılar	Kalaylılar	Auxinler
Bakteriler	Diğerleri	Kükürtlüler	Gibberellinler
Diğerleri		Nitro Bileşikler	Gibberellins+Benzylodinine
		Diğerleri	Sitokininler
2.HERBİSİTLER	4-KIŞ VE YAZ MÜCADELE YAĞLARI		İnhibitörler ve Büyüme Gerileticiler
Penoxxy Bileşikler	DNOC Ammonium	B-Sistemik fungusitler	Diğerleri
Karbamatlar	Yağ	Aminler ve Amidler	
Üre Bileşikler	Yağ + DNOC	Benzimidiazoller	
Sulfony Üreler	Yazlık Yağlar	Morpholinler	
Anilinler		Pyrimidinler	
Amidler ve Anilidler	5-FUMİGANTLAR NEMATİSİTLER	İmidazoller	
Benzoik Asitler	Fumigantlar	Triazoller	
Picolinic Asitler	Nematisitlerve Toprak Fumigantları	Diğer Sistemik Fungisitler	
Organik Halojen Asitler			
Diazinler Ve Triazinler	6-RODENTİSİT VE MOLLUSSİSİTLER	C-Biyolojik fungusitler	
Amino Fosfonatlar	Rodentisitler		
Benzopnitriller	Mollussisitler		
Siklohexonlar			
İmidazolinonlar			
Triazoller ve Oxadiazoller			
Diğerleri			

2.4.1. Etkiledikleri canlı türlerine ve kullanım alanlarına göre sınıflandırma

Pestisitler böcek kontrolünde kullanılan tüm kimyasalları kapsamaktadır. Genellikle aktif oldukları etkene, kullanıldıkları zararlı gruplarına ya da hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmada; en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir (Güler ve Çobanoğlu 1997; Tiryaki vd. 2010).

2.4.1.1. İnsektisitler

Böceklerle mücadelede kullanılan kimyasal maddelerdir. İnsektisitlerin genelde hepsi zehirlidir. İnsektisitler zararlı böcekleri kontrol altına almada kullanılırlar ve böceklerde hedef etki mekanizmaları sinir sistemi üzerindedir. Pestisitler arasında hedef olmayan canlılara da akut zehirlenme ile en fazla zarar veren insektisitlerdir (Das ve Aksoy 2016).

2.4.1.2. Herbisitler

Yabani olarak yetişen bitki örtüsünü kontrol altına almak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Tarımın yoğun olarak yapıldığı ülkelerde daha fazla kullanılmaktadır. Tarım alanı dışında endüstriyel alanlarda yetişen yabani otlarlarda mücadelede kullanılır. Herbisitlerin memeli ve böceklerde zehir etkisi azdır (Das ve Aksoy 2016).

2.4.1.3. Fungusitler

Mantarlarla mücadelede kullanılan kimyasal maddelerdir. Bitkisel üretimde en fazla kayıba sebep olan mantarlarla mücadelede kullanılır. Pestisitler içinde yaygın bir kullanımı bulunmaktadır. Mankozeb, kaptan ve thiram çoklu alan etkinliği bulunan fungusitlerdendir (Das ve Aksoy 2016).

2.4.1.4. Akarasitler

Akarlarla mücadelede kullanılan kimyasal maddelerdir. Akarların zararlı türlerini kontrol altında tutmak için kullanılır. Özellikle tarım alanlarında bitki ve toprakta bulunan akarlar için kullanımı yaygındır (Das ve Aksoy 2016).

2.4.2. Kimyasal yapılarına göre pestisitlerin sınıflandırması

2.4.2.1. Organofosfat pestisitler

Organofosfor (OP) bileşikleri 1940'ların başlarında gelişirken, 1950'lerde karbamatlar insektisit olarak tanıtılmıştır. Her iki sınıfın bileşikleri, farklı toksikolojik özellikler sergilemelerine rağmen, asetilkolinesteraz (AChE) enziminin ortak bir toksisite hedefine sahiptir. OP'lerin genel kimyasal yapısı, bir oksijen (O) veya Sülfür (S) ile bir çift bağ ile bağlanmış bir fosfor (P) atomundan, iki alkoksi grubuna (OCH₃ veya OC₂H₅) üç tek bağın bağlanmasıyla oluşan farklı kimyasal gruba "çıkış grubu" denir (Costa 1988).

2.4.2.2. Karbamil grubu pestisitler

Karbamat insektisitler, karbamik asitten türetilir ve orta dereceden düşük toksisiteye (karbaril) kadar çok yüksek toksisiteye değişen farklı akut oral toksisiteye sahiptir. En çok kullanılan OP insektisidleri fosfora bağlı bir sülfür içerir ve biyolojik (veya toksik) aktivitelerini uygulamak için metabolik olarak aktif hale getirilmeleri gerekir çünkü sadece OP parçası olan bileşikler AChE'nin etkili inhibitörleridir. Bu biyoaktivasyon, sitokrom P450 familyasının (CYP) enzimlerinin aracılık ettiği bir oksidatif desülfürasyondan oluşur. Bu durum bir "okson" ya da ana insektisit oksijen analogunun oluşumuna yol açar. Diğer tüm biyotransformasyon reaksiyonları, daha az veya hiç toksisiteye sahip olmayan metabolitlere yol açtıklarından, detoksikasyon reaksiyonlarıdır. Bazıları CYP'ler tarafından aracılık edilirken, diğerleri, esterazlar (örneğin paraoksonaz, karboksilesteraz) olarak bilinen enzimlerin aracılık ettiği hidrolitik reaksiyonlardır (Costa 1988; Lotti 2000).

Bununla birlikte, karbamat zehirlenmesinin işaret ve semptomları, OP'lerle zehirlenme sonrasında gözlenenlerle aynıdır ve miosis, idrara çıkma, diyare, salivasyon, kas fasikülasyonu ve CNS etkilerini içerir. OP'lerden farklı olarak, karbamatların akut zehirlenmesi genellikle birkaç saat içinde çözülür. Karbamatlar doğrudan AChE inhibitörleridir ve metabolik biyoaktivasyon gerektirmezler. Karbamat zehirlenmesinin tedavisi muskarinik antagonist atropin kullanımına dayanır. Oksimlerin, karbarilin toksisitesini şiddetlendirdiği gösterilmiştir, fakat aldikarb gibi diğer karbamatlarda yararlı etkiler gösterebilir (Ecobichon 2001).

2.4.2.3. Organa klorür pestisitler

Organoklorin insektisitleri DDT ve bunun analoglarını içerir. 1940'lardan 1970-80'lere kadar, organoklorin insektisitleri tarımda, böcek kontrolünde ve sıtma kontrol programlarında yaygın olarak kullanılmıştır. Akut toksisiteyi ılımlıdır (organofosfatlarınkinden daha azdır). Ancak kronik maruziyet özellikle karaciğer ve üreme sisteminde olumsuz sağlık etkileri ile ilişkili olabilmektedir. Toksisitesinin, hayvanlarda ve insanlarda birincil belirtileri, titremelerin varlığıdır. Esas olarak ekolojik değerlendirmeler nedeniyle, bu bileşikler son otuz yılda çoğu ülkede yasaklanmıştır (Guzelian 1982).

2.4.2.4. Piretroid pestisitler

Piretroid insektisitlerin kullanımı, son yıllarda zararlı organizmalara karşı kimyasal potansiyelleri, nispeten düşük toksisitesi ve çevre ortamındaki olumlu profilleri nedeniyle organofosfat ve karbamat insektisitlerinin yerini almıştır (Schleier ve Peterson 2011). Piretroid insektisitleri, sinir hücrelerinin sodyum iyonlarına geçirgenliğini değiştirerek periferik sinir sisteminin normal fonksiyonunu bozan nörotoksik ajanlardır. Tekrarlayan sinir uyarıları, böceklerde ve diğer zararlılarda inkoordinasyona, kasılmalara ve felce neden olur (Soderlund ve Bloomquist 1989).

Genel popülasyonda piretroid insektisitlerin başlıca maruziyet yolunun beslenme olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (Schettgen vd. 2002). Ancak, ev ve bahçe böcek ilaçları, evcil hayvan spreyleri ve şampuanlar, bit tedavileri ve giysilere uygulanan sivrisinek kovucuları gibi yaygın ev ürünlerindeki kullanımları da kısa süreli maruziyete yol açabilir. Küçük çocukların daha fazla maruz kalmaları zemine daha yakın olmaları ve böcek öldürücülerin yerleşebileceği yüzeylere, el ağız teması çok fazla olmasından dolayı daha yüksek idrar konsantrasyonlarında piretroid insektisit metabolitleri bulunmaktadır.

2.5. Pestisitlerin Çevreye Olan Etkileri

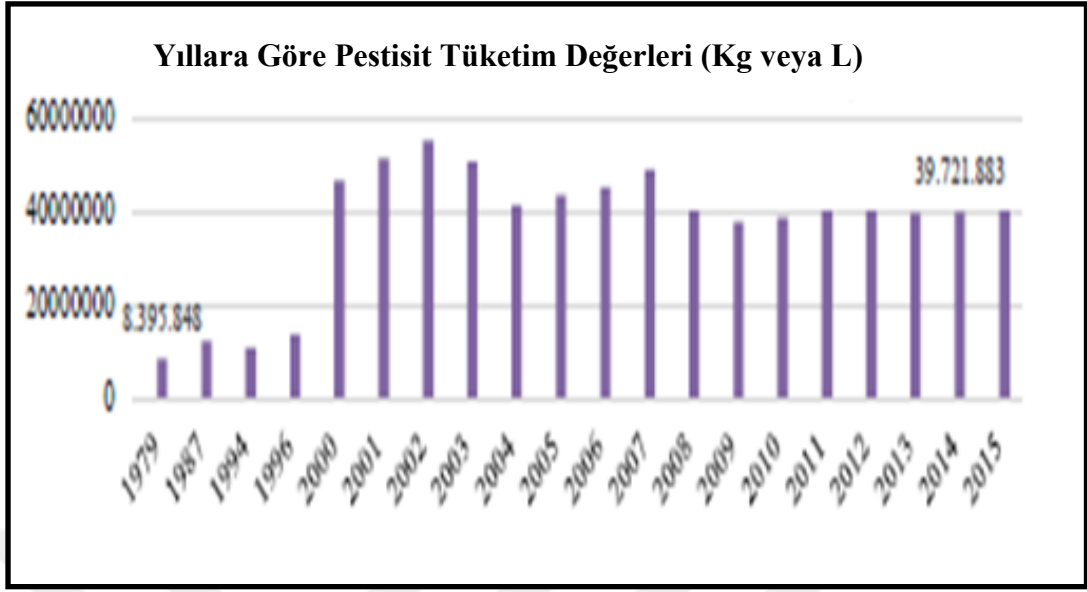
Pestisitler, belirli organizma gruplarına zehirli olacak şekilde tasarlandığından, diğer canlılar üzerinde hava, toprak veya su gibi çeşitli ortamların yanı sıra önemli olumsuz çevresel etkiye sahip olabilirler (Aktar vd. 2009).

Bazı pestisitler bozulmaya direnen ve dolayısıyla çevrede yıllarca kalan organik kirleticiler (örneğin aldrin, klordan, diklorodifeniltrikloroetan (DDT), dieldrin, endrin, heptaklor ve heksaklorobenzen) kalıcıdır (Yadav vd. 2015). Dahası, bu tür bileşikler biyolojik olarak birikme ve biyolojik olarak parçalanma kabiliyetine sahip olduklarından, başlangıç konsantrasyonuna göre 70 kat kadar biyokonsantre edilebilirler (Hernández vd. 2013a). Pestisitlerin tekrarlanan uygulaması biyoçeşitlilik kaybına ve daha yüksek haşere direncine yol açarken, diğer türler üzerindeki etkileri zararlıların yeniden canlanmasını kolaylaştırmaktadır (Damalas ve Eleftherohorinos 2011). Uygulanan pestisitlerin % 95'inin, hedef olmayan organizmaları etkileme potansiyeli ve çevrede yaygın olarak dağılma potansiyeli taşıdığı tahmin edilmektedir (Simeonov vd. 2013).

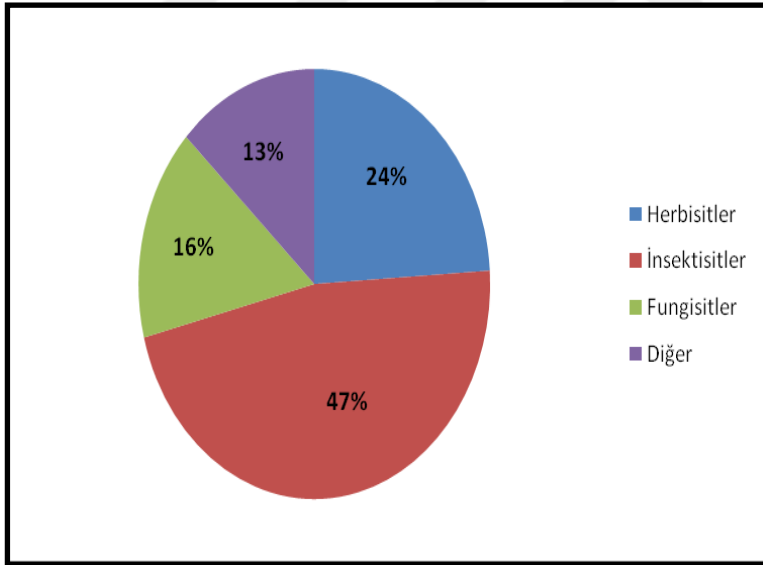
2.6. Türkiye Pestisit Kullanımı

Zirai olarak tarımda zararlılara karşı farklı teknik ve yöntemler arasında kimyasal mücadelenin % 95'lik paya sahip olduğu bilinmektedir. Kaliteli ve verimli ürünler elde edebilmek için pestisit uygulaması kaçınılmazdır. Kimyasal uygulama yapılmadığı durumlarda % 60'a varan oranlarda ürün kaybı olmaktadır. Bu nedenle ürünlerin zarar görmesini önlemek amacıyla Dünya'da tüm ülkelerin kullandığı gibi ülkemizde de zararlılarla mücadelede kimyasal uygulamaları yoğun olarak kullanılmaktadır. Türkiye'nin hektar başına pestisit tüketiminin AB ülkelerine oranla daha az olduğu ancak yoğun olarak tükettiği pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli risk taşıyanlardır (Tiryaki vd. 2010).

Türkiyede pestisit kullanımı 1960'lı yıllardan sonra yaygınlaşmaya başlamıştır. Günümüze kadar katlanarak hızla kullanımı artmıştır (Şekil 2.1) (Arslan 2016). Türkiyede en fazla kullanılan pestisit grubu insektisitlerdir (Şekil 2.2) (Tiryaki vd. 2010).



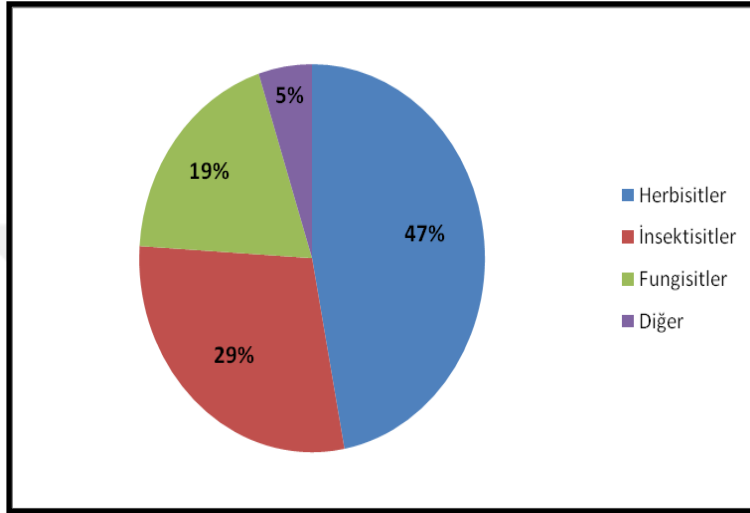
Şekil 2.1. Yıllara göre pestisit tüketim miktarı (Delen vd. 2005; GTHB 2015)



Şekil 2.2. Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı (Tiryaki vd. 2010)

2.7. Dünyada Pestisit Kullanımı

İnsektisitlerin önemli bir sınıfı olan piretroidler 2015 yılında Dünya insektisit pazar payının % 38'ini oluşturmuştur. Dünya'da insektisit kullanımı ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.3). FAOSTAT verilerine göre 1990-2013 yıllarında rapor edilen piretroid aktif madde kullanımı yaklaşık olarak 7000 tonluk bir değere ulaşmıştır. İnsektisit kullanımında coğrafi konum olarak ilk beş sırada Ukrayna, Pakistan, Türkiye, Paraguay ve Hindistan yer almaktadır (Li vd. 2017).



Şekil 2.3. Pestisit gruplarına göre Dünya'da tarım ilacı kullanımı (Tiryaki vd. 2010)

2.8. Pestisitler

Pestisitler, canlı organizmaları (ör. Yabani otlar (herbisitler), böcekleri (böcek öldürücüler), mantarları (mantar öldürücüler) ve kemirgenleri (kemirgen öldürücüler)) öldürmek için kasten çevreye bırakılan az sayıdaki toksik maddeden biridir. Her ne kadar böcek ilacı terimi çoğu zaman sadece insektisitlere değinmekle yanlış anlaşılrsa da, zararlı otları kontrol etmek için kullanılan herbisitlere, fungisitlere ve diğer çeşitli maddelere de uygulanabilir (Matthews 2006).

Pestisitler, günümüz dünyasının çevresel kirlenmesinde rol oynayan temel faktörlerden biri olarak kabul edilir. Bu kimyasallar, haşere ve hastalık vektörleri için zehirli olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu bileşikler insektisit, herbisit ve fungisit olarak pazarlanan 1000'den fazla aktif bileşen arasındadır. Bununla birlikte, yeni ve güçlü pestisitlerin formülasyonu, Dünya nüfusu arttıkça zararlılara karşı dayanıklılık, hijyenik kontroller ve daha fazla gıda için başlıca insan ihtiyacı nedeniyle araştırmacıların ve üreticilerin istek sırasına göre artmaktadır (Mostafalou ve Abdollahi 2017).

Pestisitlerin aktif maddeleri ya organikdir (karbon içerir) ya da inorganiktir (bakır sülfat, demir sülfat, bakır, kireç, kükürt vb.) (Gunnell vd. 2007). Organik pestisitlerdeki kimyasallar, suda daha inorganik böcek ilaçlarına göre daha karmaşık ve daha az

çözünür olma eğilimindedir (Debost-Legrand vd. 2016). Organik pestisitler ek olarak iki gruba ayrılabilir, doğal (doğal olarak oluşan kaynaklardan üretilir) ve sentetik (yapay olarak) sentezle üretilir. Böcek ilaçları farklı eylem modlarına veya kontrol etme yollarına sahiptir. Yiyeceklerimizin üretiminde ve sağlığımızı korumada 800'den fazla pestisit kullanılmaktadır (Kim vd. 2017).

Pestisitler tarım ürünlerinin geliştirilmesi ve bulaşıcı hastalıkların kontrol edilmesi yoluyla insan yaşamına büyük ölçüde fayda sağlamış olsa da, bunların yaygın ve kontrol dışı kullanımlarının çevre ve insan sağlığında oluşturacakları potansiyel risklerin ortaya çıkarılması açısından daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmalar, genetik polimorfizmleri ksenobiyotiklere karşı bireysel duyarlılık belirleyicileri olarak göstermiştir, bunlar arasında pestisitler bulunmaktadır. Pestisitleri metabolize eden enzimlerdeki genetik değişiklikler, bireylerin maruz kaldığı daha büyük veya daha az toksisiteyi açıklığa kavuşturmaya yardımcı olabilir. Ek olarak, AChE'nin inhibisyonunun, pestisit toksisitesinin neden olduğu semptomlarla ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (Simoniello vd. 2010b). Mevcut çalışmaların raporları, kırsal alanda çalışanlarda kolinesteraz aktivitesinin kontrol deneklerine göre azaldığını göstermektedir (Singh vd. 2011).

Tarımın, çeşitli böcekleri kimyasal olarak kontrol etmek için en büyük tüketicisi (dünya üretiminin yaklaşık % 85'i) pestisittir. Pestisit kirliliğinin çevresel etkisinin ve bu etkisinin ışığında, pestisitlerin sınıflandırma, kirlilik durumu, nakil rotası ve insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili genel yönlerini tanımlamak üzere birçok araştırma yapılmıştır. Pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve ekolojik sistemler üzerindeki zararlı etkileri ile ilgili olarak yayınlanan çalışmalar bulunmakta ve her geçen gün artan pestisit çeşitliliği ile olası tehlikelerinde beraberinde ortaya çıktığı görülmektedir.

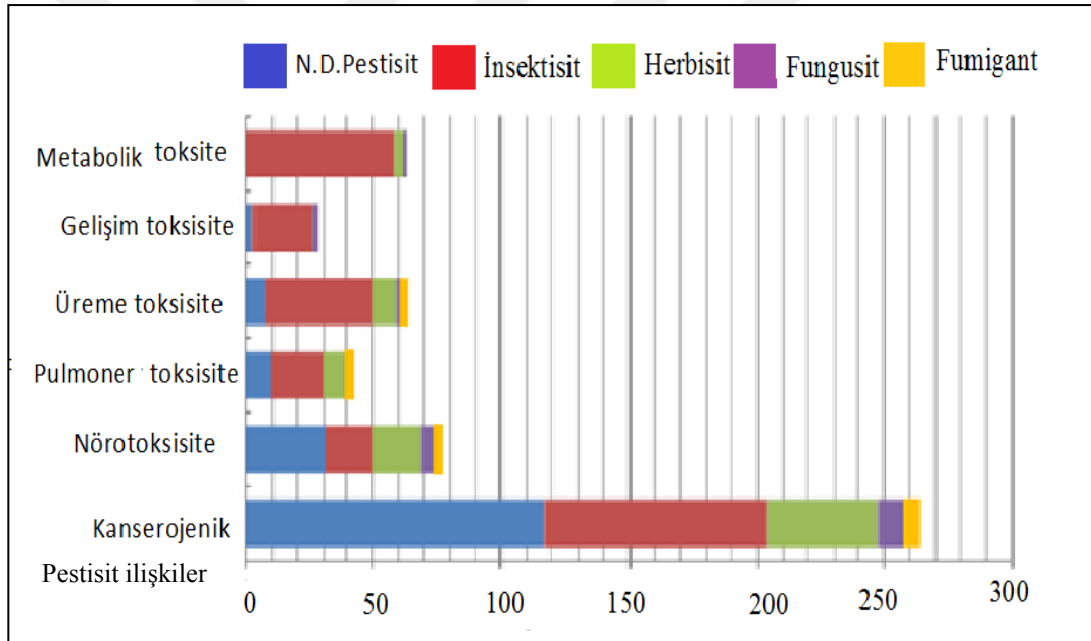
Zirai endüstrilerde ve tarımsal endüstrilerde gün geçtikçe yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, mahsulleri potansiyel tehditten koruyarak üretimi arttırmaktadır. Böcek ve diğer istenmeyen canlıları önlemek için evlerde ve diğer kamusal alanlarda da kullanılmaktadır. Ayrıca, pestisitler aynı zamanda, süs bitkileri, parklar ve bahçelerdeki vektörle bulaşan hastalıkların (örneğin, sıtma ve dang) ve istenmeyen bitkilerin (ör., Ot ve yabancı otlar) kontrol edilmesi için halk sağlığı faaliyetlerinde de kullanılır. Aynı zamanda elektrikli ekipman, buzdolabı, boya, halı, kâğıt, karton ve gıda ambalaj malzemelerinde haşerelerin, bakterilerin, mantarların ve alglerin çoğalmasını önlemek veya öldürmek için de yararlıdırlar (Gilden vd. 2010).

Pestisit kullanımındaki amaç, tarımsal üretimde tüm mücadele yöntemleri arasında en fazla kullanılan yöntemin kimyasal mücadele yöntemi olmasıdır. Kimyasal mücadele diğer mücadele yöntemlerine göre sahip olduğu yüksek etkinlik ile hızlı sonuç alınmasında, ürünün toksin salgılayan zararlı organizmadan korunmasında ve kontrollü kullanıldığında ekonomik olması yönüyle daha fazla tercih edilmektedir (Tiryaki vd. 2010).

Pestisitler diğer kullanım alanları yanında Dünya’da halk sağlığı alanında özellikle sıtma ile mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Halk sağlığında kullanılan pestisitlerin hedef canlıya spesifik olarak toksik olması, insanlara zararlı olmaması, ucuz ve kolay uygulanabilen, yanıcı, patlayıcı, korozif ve boyayıcı etkisi olmayan ayrıca kolayca toksik olmayan maddelere dönüşebilen kimyasallar olmalıdır (Güler ve Çobanoğlu 1997).

2.9. Pestisit Toksisitesi

Pestisit maruziyetinden kaynaklanan sağlık tehlikeleri riski, sadece içerik maddelerinin ne kadar zehirli olduğuna değil, aynı zamanda maruz kalma düzeyine de bağlıdır. Belirli kişilerde çocuklar, hamile kadınlar veya yaşlanan nüfuslar gibi böcek ilaçlarının etkilerine karşı diğerlerine göre daha hassas olabilirler. Pestisit kullanımının insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalar, pestisitlerin, kanser türleri, parkinson, alzheimer, lösemi ve astım dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.4) (Kim vd. 2017).



Şekil 2.4. Zirai ilaçların toksisite türleri hakkında kanıtların ağırlığını gösteren şematik diyagram (Mostafalou ve Abdollahi 2017’den uyarlanmıştır)

2.9.1. Parkinson

Parkinson hastalığı, substantia nigra’da dopaminerjik nöronların dejenerasyonu (titreme ve kas kontrolü) ile karakterize edilen, CNS’nin motor progresif bir bozukluğudur. Bu dejenerasyonun nedeni iyi bilinmemekle birlikte, postmortem çalışmalar, bozukluğun gelişiminde oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun temel rolü olduğunu göstermiştir. Pestisitlere maruz kalan kişilerde Parkinson hastalığı insidansının daha yüksek olduğunu gösteren çok sayıda popülasyon çalışması

bulunmaktadır (Bonetta 2002; Freire ve Koifman 2012; Van Maele-Fabry vd. 2012). Araştırmalarda rotenone ve paraguata gibi bazı böcek ilaçları, bu dopaminerjik nöronları bozarak ve dopamin üretimini inhibe ederek Parkinson hastalığına neden olduğu kanıtlanmıştır (Mostafalou ve Abdollahi 2013).

Parkinson ve diğer nörodejeneratif bozuklukların, organofosfatlar, karbamatlar, organoklorinler, piretroidler ve bazı diğer insektisitler gibi nörotoksik pestisitlere maruz kalmaları durumunda ortaya çıktığı bu alanda yapılan birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Pestisitlere maruziyet sonucu kimyasallar sinir sisteminde iyon kanallarının nörotransmisyonu ve fonksiyonu ile etkileşime girer (Costa vd. 2008).

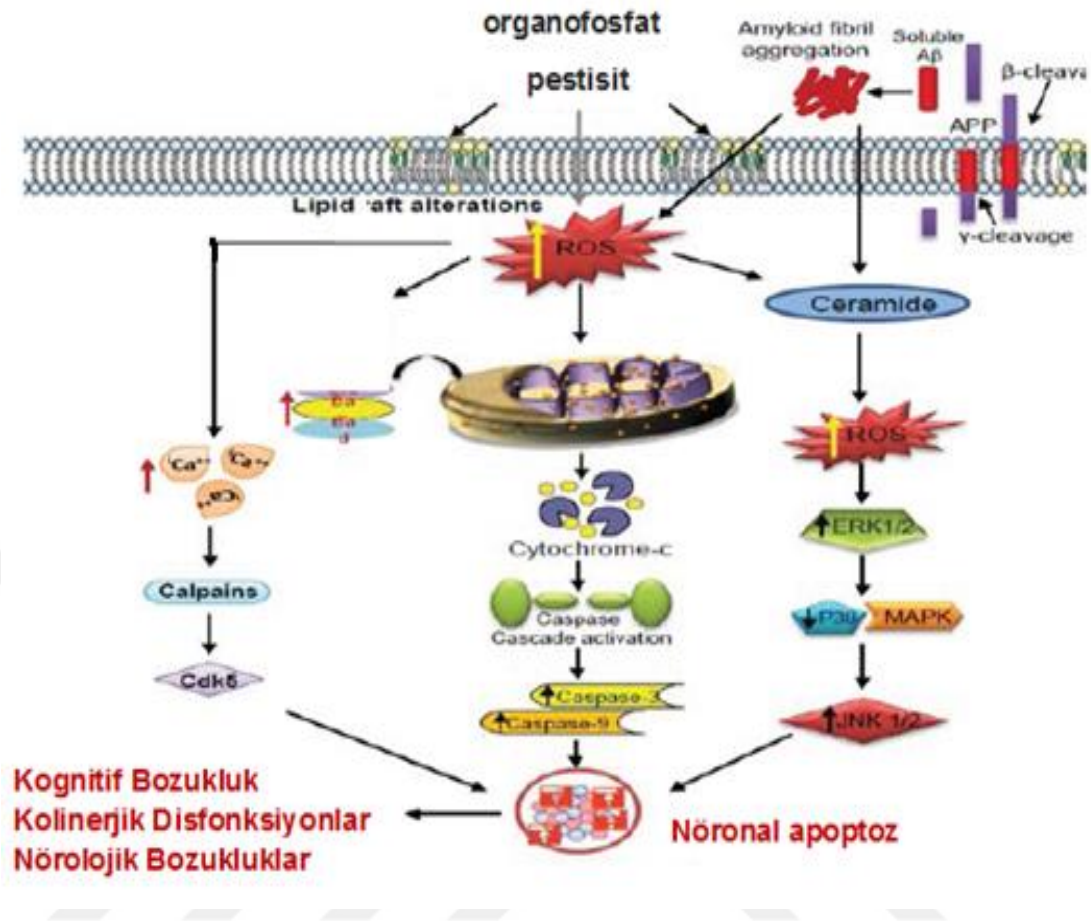
Araştırmalar Parkinson hastalığı ile pestisit maruziyeti arasında bir ilişki olduğunu ve bu ilişkinin ksenobiyotik metabolitlerinin mitokondri metabolizmasını modüle ettiğini göstermiştir (Şekil 2.5) (Couteur vd. 1999).



Şekil 2.5. Pestisitlerin neden olduğu mitokondri hasarı (Chen vd. 2017'den uyarlanmıştır)

2.9.2. Alzheimer

Alzheimer hastalığı, kognitif fonksiyonların, hafıza süreçlerinin ve ilişkili davranışların kaybına yol açan ilerleyen yaşla ilişkili nörolojik bozukluktur. Alzheimer hastalığının etiyolojisinde çevresel faktör ve genetik duyarlılığın rolü son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. Pestisitlerden organofosfatların tarım, ev, bahçe, halk sağlığı alanlarında yaygın olarak kullanılması sonucunda maruz kalan kişilerde Alzheimer hastalığının gelişme riskinin ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 2.6) (Yadav vd. 2016). Parron vd. (2011) ekolojik bir çalışmada, diğerleri yüksek düzeyde pestisit kullanımı olan bölgelerde yaşayan insanların Alzheimer hastalığı riskinin yüksek olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.6. Nöronal apoptozun ayrıntılı mekanizması (Yadav vd. 2016'den uyarlanmıştır)

2.9.3. Diabet

Diabet insülin üretiminin azalması, insülin eylemi veya her ikisine bağlı olarak hiperglisemi ile karakterize bir grup hastalığı kapsamaktadır. Tüm diabet hastalarının yaklaşık % 90'ı Tip 2 diyabet (T2D) tir (Nolan vd. 2011). Diyabet, şu anda 350 milyondan fazla insanı etkileyen ve 2050 yılında 550 milyona ulaşması beklenen dünya çapında bir salgındır (Whiting vd. 2011). Tedavinin hem maliyeti ve aynı zamanda diyabetle ilişkili morbidite ve mortalite yükü nedeniyle, dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorununu temsil etmektedir (Evangelou vd. 2016).

Çevresel kirleticilere, özellikle pestisitlere maruziyet ile diyabet gelişiminin arasındaki ilişki ile ilgili araştırmalar hızla artmaktadır (Mostafalou ve Abdollahi 2012b). Yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, pestisitlere maruziyetin diyabet geliştirmede potansiyel bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir (Everett ve Matheson 2010). Son birkaç yılda ortaya çıkan kanıtlar, çevresel kirlenici maddelerin de önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Evangelou vd. 2016).

2.9.4. Kanser

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kanseri, vücudun her bölümünü etkileyen büyük bir grup neoplastik hastalık için genel bir terim olarak tanımlar. Kanser, Dünya çapında mortaliteyi önde gelen nedenlerden biri olup, 2012 yılında yaklaşık 8.2 milyon kanser kaynaklı ölümle sonuçlanmıştır. Aynı yıl, yeni kanser vakaları 14 milyonu tahmin etmiştir ki bu da önümüzdeki yirmi yılda % 70 oranında artacaktır. En sık görülen kansere bağlı ölümler, akciğer, karaciğer, mide, kolorektal, meme ve özofagus kanserine bağlıdır.

Kanser, biyolojik, fiziksel ve kimyasal etkilerin etkisiyle göreceli olarak tetiklenen genetik çevresel etkileşimlerin bir sonucudur (WHO 2015). Son yarım yüzyılda insektisitler, herbisitler ve kanser insidansı olan fungusitler de dahil olmak üzere farklı pestisit sınıflarına maruz kalma arasındaki ilişki vurgulanmıştır. Farklı türdeki araştırmalar, pestisitlerin kanserlerle bağlantısını hedeflemiş ve çeşitli risk tahminlerini rapor etmiştir. Pestisitlere maruziyet ile kanser insidansı arasında pozitif bir ilişki olduğunu gösteren raporların sayısı oldukça fazladır ve popülasyona dayalı insan çalışmalarından elde edilen ilgili sonuçlar gözden geçirilmiş ve kansere göre sınıflandırılmıştır (Mostafalou ve Abdollahi 2017).

2.9.5. Genetik Hasar

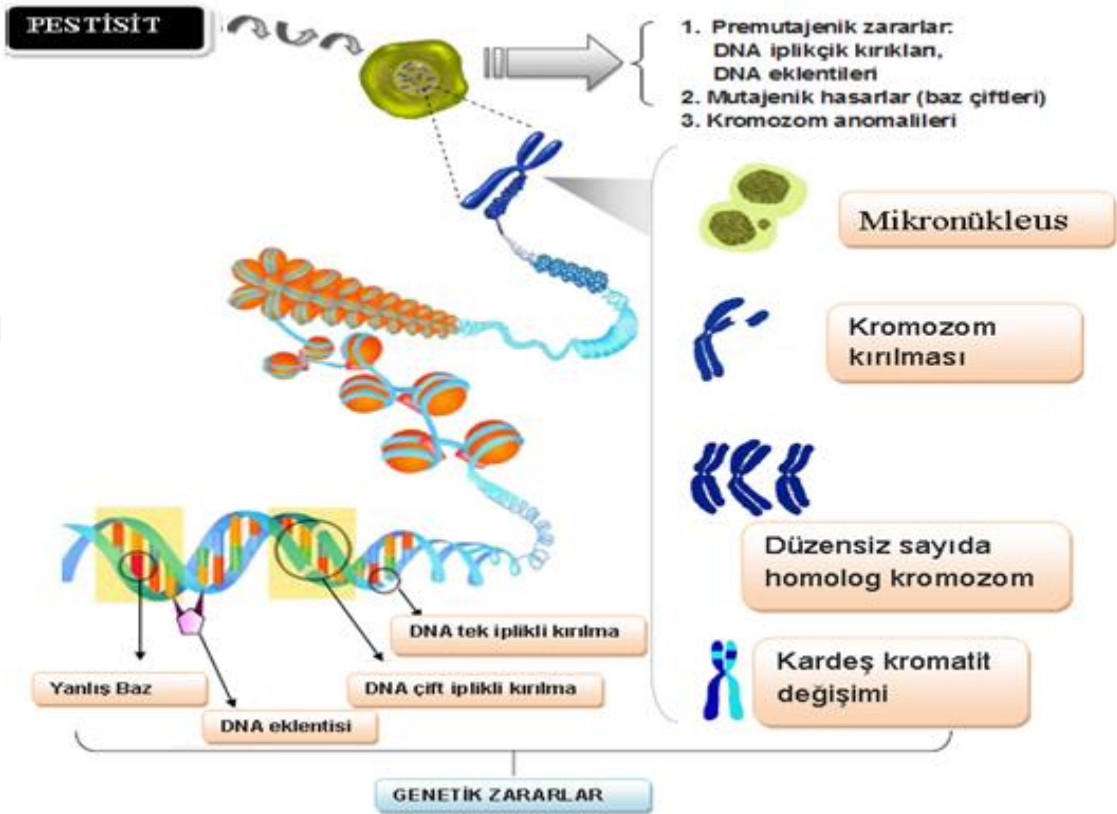
Genetik hasarlar, DNA hasarı veya kromozom anormallikleri ile sonuçlanan ve karsinogenez ve teratojeniz bağlamında kronik hastalıklar için birincil mekanizma olarak düşünülen genetik materyalle doğrudan etkileşimden kaynaklanır. Genetik toksikoloji alanında çalışılmış ve farklı genotoksisite testleri ile tespit edilebilmektedir. Pestisitlerin genetik toksisitesi ile ilgili verilerin giderek artması, kromozomal anormallikler, mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve kuyruklu yıldız analizi gibi farklı tedavi türlerini kullanan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan toplanmıştır (Bolognesi 2003; Bull vd. 2006).

Genetik hasarlar aşağıdaki gibi üç gruba ayrılır:

1. DNA iplikçik kırılması, DNA eklentileri veya planlanmamış DNA sentezi gibi premutagenik hasarlar.
2. Bir çift baz çiftinin sokulması veya silinmesi anlamına gelen Gen'in mutasyonu,
3. Kromozomal aberasyonlar, tüm kromozom (anöploidi) kaybı veya kazanılması, silinmesi veya kırılması (klastojenisite) ve kromozom segmentleri veya yeniden düzenlemeler.

Premutagenik hasarlar hücre bölünmesinden önce tamir edilebilirken, ikinci ve üçüncü gruptaki hasarlar kalıcıdır ve hücre bölünmesinden sonra hızla çoğalma kabiliyetine sahiptir (Guy 2005).

Kanser indüksiyonu veya gelişimi için ana olaylardan biri olarak genetik zararlar göz önüne alındığında, pestisitlerin genotoksitesine odaklanan daha ileri çalışmalar, tabi ki diğer bazı teşvik edici faktörlerle birlikte karışımlarına maruz kalma gibi uygun modellerde, kanserojen ve tümörjenik mekanizmaların anlaşılması için gereklidir (Zeljezic ve Garaj-Vrhovac 2001).



Şekil 2.7. Genetik hasarın oluşumu (Mostafoulu ve Abdollahi 2013'den uyarlanmıştır)

Genotoksik potansiyel, kanserojen ve üreme toksikolojisi gibi uzun süreli etkiler için birincil risk faktörüdür. Kimyasal bileşiklerin genotoksik hasarı, kimyasal bileşiklerin metabolizmasında ve DNA onarım mekanizmalarında yer alan varyant polimorfik genlerin bireysel kalıtımından da etkilenebilir (Şekil 2.7) (Bolognesi 2003).

Pestisitler, ksenobiyotik enzimler (XMEs) tarafından ya vücuttan atılan aktif olmayan bir forma ya da DNA'ya bağlanabilen aktif metabolitlere metabolize edilirler. Bu bağlanma, doğrudan ve dolaylı DNA hasarına neden olabilir ve sonuç olarak çeşitli hastalıkların başlamasını ve ilerlemesini içerebilir. DNA hasarı çeşitli genotoksik testleri ile tespit edilebilir (Tumer vd. 2016). Farklı çalışmalarda pestisitlerin gen ifadelerinde değişikliklere, DNA zincir kırılmaları, kromozomlarda ayrılmama, nokta mutasyonu, delesyon ve rekombinasyon gibi genotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Bolognesi 2003).

2.10. Piretroidler

Piretroidler, doğal olarak krizantem çiçeklerinde bulunan piretrinlerden türetilen organik insektisit sınıfı bir kimyasaldır. Piretrinler, insektisidal gücü arttırmak su, nem ve güneş ışığı varlığında uzun ömür sağlamak için sentetik olarak modifiye edilmiş siklopropan karboksilik asit ve bir siklopentenolon alkolün esterleridir (Elliott 1995). Piretroidlerin kimyasal yapıları, piretrinlerin asidik asit ve alkol bileşimini muhafaza etmesi nedeniyle sınıflar arasında benzerlik vardır (USEPA 2013a).

Yabani bir bitki olan *Piretrum*, eski Yugoslavya ve Pers'in Dalmaçya bölgesine özgüdür. Aşağıdaki üç tür taksonomik olarak sınıflandırılır,



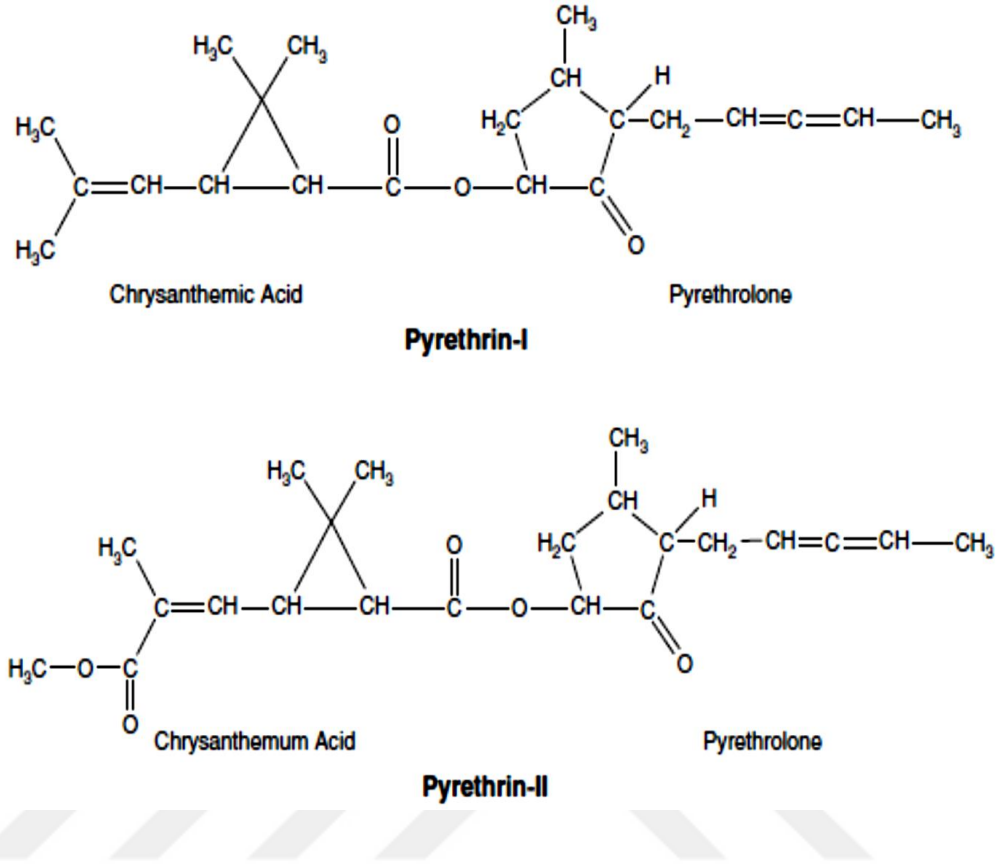
1. *Chrysanthemum cinerariaefolium* (*Tanacetum cinerariaefolium*)
2. *C. roseum* (*T. coccineum*)
3. *C. Marshalli* Ascherson.

C. cinerariaefolium (1) beyaz çiçekli bir türdür ve diğer türlere göre daha fazla insektisit madde içermektedir.

İtalya'nın doğusundaki Adriyatik Denizi'nin Akdeniz kıyısında eski Yugoslavya bölgesinde 1694 yılında keşfedildiği bilinmektedir. Bu bölgede bulunan pire otunun böcek öldürücü aktivitesi ve insektisit uygulamaları için toz formunda kullanıldığının daha önceden bilinmesi 1840 yılında doğrulanmıştır (Matsuo ve Mori 2012).

1885 yılında ilk Japonya'ya *piretrum* getirilmiştir. Alman kökenli Megura *Piretrum* çiçeklerini Tokyo'daki Tıbbi Bitki Bahçesi'ne dikmiştir. Başka bir kayda göre, bir Amerikan kaynağından gelen *piretrum* çiçekleri, Komaba, Tokyo'daki Tarım Koleji'nin test çiftliğinde yetiştirilmiştir. İlk kez Wakayama vilayetinde yetiştirmeye başladıktan sonra Piretrinlerin *piretrum*un çiçeklerinde, ancak yapraklarda bulunmadığı ve bu nedenle kuru çiçeklerin ve kurutulmuş çiçeklerin özlerinin satıldığı söylenmiştir (Matsuo ve Mori 2012).

1950 yılında yaklaşık iki yıl süren analizler sonucunda Piretrin I ve Piretrin II içeriğinin belirlenmesi yapılmıştır (Şekil 2.8). *Piretrum* yapraklarından elde edilen piretrinlerin insektisidal gücü *Musca domestica* ile doğrulanmıştır. Katsuda vd. (1999) yılında ayrıca *C. roseum*'un (yayınlanmamış) genç yapraklarında ve çiçeklerinde altı madde - piretrin I ve II, cinerin I ve II ve jasmolin I ve II - varlığını doğrulamıştır. Bu arada, piretrinlerin bu bileşeni insektisitler için güvenli bir hammadde olarak yeniden değerlendirilmiş ve bu da doğal ürünlere geri dönme eğilimini yansıtmaktadır (Matsuo ve Mori 2012).



Şekil 2. 8. Piretrin I ve II açık formülü (Matsuo ve Mori 2012)

Piretroidler birçok alanda zararlı böcekleri kontrol etmek amacı ile kullanılmaktadır. Bu bağlamda böceklerin yaygın olarak bulunduğu, depolar ve kamu binaları gibi kapalı ortamlarda insektisit olarak kullanılmaktadır. Bunlar evcil hayvan şampuanlarında, uyuz tedavisi için kullanılan ilaçlarda bulunurlar. Permetrin gibi bazı piretroidler, böcek kovucu (repellent) maddeler olarak kumaşa (ör., Halılar, battaniyeler, üniformalar) emdirilebilirler. 1980'lerden beri, organofosfor ve karbamik ester bileşikleri gibi diğer insektisitlere kıyasla yüksek etkinlik ve düşük toksisiteye sahip olmalarından dolayı Dünya çapında kullanılmaktadır (Yoo vd. 2016).

Piretroid pestisitler, alfa-siyano grubunun varlığına ve üretilme değişikliklerine bağlı olarak geniş ölçüde Tip I ve II'ye ayrılırlar (Saka vd. 2011). Tip I piretroidlerde alfa-siyano grubu bulunmaz ve allethrin, bifenthrin, d-fenothrin, permethrin, resmethrin, tetramethrin ve bunların benzer analoglarını içerirler. Tip II alfa-siyano grubunu bulundurur ve cypermethrin, deltamethrin, sihaothrin, sifürin, fenvalerat ve farklı analogları gibi bileşikleri içerirler (Anadón vd. 2009). Moleküler yapılarına dayanarak, tarımsal piretroidler (orta toksisitesi olan alfa grubu içeren) ve kentsel piretroidler (düşük toksisiteli alfa grubu içermeyen), sırasıyla tarım ve tarım dışı haşere kontrolü için kullanılanlardır (Gong 2013).

Piretroidler yüksek insektisit potansiyeline ve düşük memeli toksisitesine sahiptir. Gerçekten de, yaygın kullanımlarına rağmen, insan zehirlenmelerinde az sayıda raporu vardır (Bradberry vd. 2005). Sıçanlarda üretilen Tip I bileşikler, belirgin davranışsal uyarılma, agresif müsabaka, artan keskin tepki ve tüm vücut titremesine ilerleyen ince vücut titremesi ve prostrasyon (T sendromu) içeren bir sendromdur. Tip II bileşikler bol miktarda salivasyon, koreoatetoza ilerleyen kaba tremor ve klonik nöbet (CS sendromu) üretirler (Soderlund vd. 2002; Ray vd. 2006).

Bununla birlikte, bazı piretroidler, iki sendromun bir kombinasyonunu oluşturdukları için böyle bir sınıflandırmayı yok ederler. Piretroidlerin etki mekanizması böceklerde ve memelilerde, sodyum kanalına bağlandıkları ve aktivasyonunu yavaşlattığı gibi inaktivasyon hızının sabit olduğu ve stabil bir hipereksibl duruma yol açarlar (Vijveberg vd. 1982). Tip I bileşikleri, tekrar eden potansiyel aksiyon potansiyeli için kanal uzunluğunu (<10 msn) uzatarak, tip II bileşiklerin kanalları daha uzun bir süre (> 10 msn) açmasını sağlar, böylece membran potansiyeli eninde sonunda aksiyon potansiyeli üretiminin mümkün olmadığı noktaya depolarize edilir (depolarizasyona bağlı blok) (Ray vd. 2006).

Sodyum kanallarının açılma zamanındaki bu farklılıkların, T ve CS sendromları arasında gözlenen farklılıklar temelinde olduğuna inanılmaktadır (Ray vd. 2006). Tip II piretroidler, sodyum kanallarını etkilemek için yeterli olanlardan daha yüksek konsantrasyonlarda da olsa GABA kapılı klorür kanallarını da inhibe edebilir (Lawrence ve Casida 1983). Tip II piretroidler ayrıca düşük konsantrasyonlarda, voltaj bağımlı klorür kanallarını da inhibe ederler (Ray ve Forshaw 2000). Bu iki etkinin, CS sendromunda görülen koreoatetoz, tükürük ve nöbetlere aracılık ettiğine inanılmaktadır.

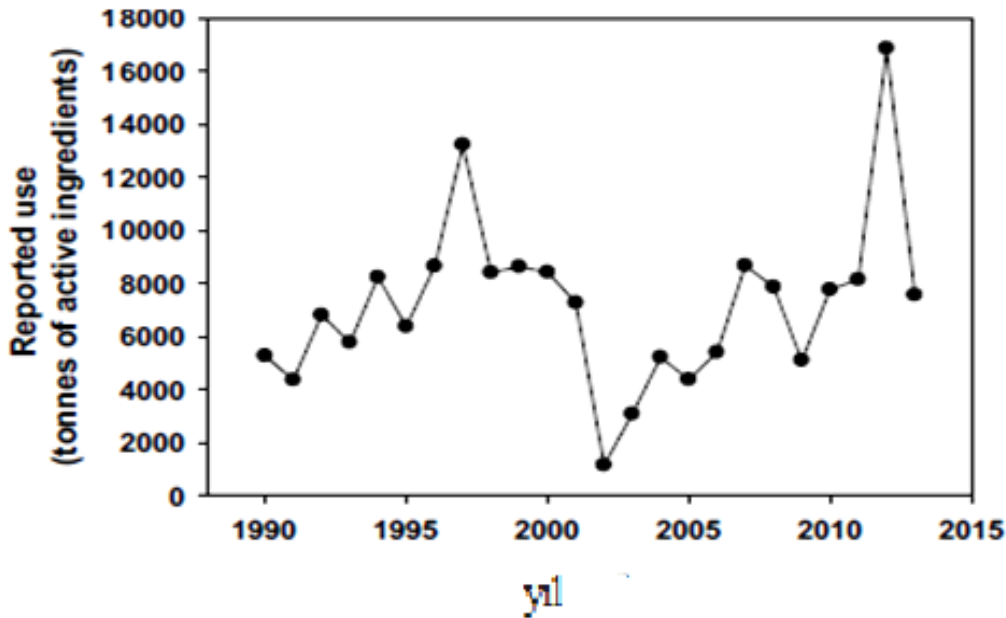
İnsanlarda piretroid maruziyetleri, tahriş edici etkiler, baş dönmesi, seğirme ve sinir bozuklukları ile sonuçlanmıştır. Tip I piretroidler tekrarlayan sinir deşarjları üretirler ve huzursuzluk, hipereksistasyon, kapanma ve vücut titremelerine neden olurlar. Tip II piretroidler, uyarana bağımlı sinir depolarizasyonu ve tıkanması üretirler (Soderlund ve Bloomquist 1989; Ecobichon 1996). İntoksikasyonun klinik semptomlarının meydana geldiği doz aralıkları, farklı piretroidler için geniş ölçüde değişmektedir (ATSDR 2001; ATSDR 2003).

Mesleki maruziyet üzerine, piretroidlerle dermal temastan kaynaklanan birincil yan etki, parestezidir (He vd. 1989). Semptomlar sürekli karıncalanma veya iğnelemeyi veya daha şiddetli yanmayı içerir. Parestezi muhtemelen deri sinir terminallerindeki anormal piretroidin neden olduğu tekrarlayıcı aktiviteye bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Ray ve Fry 2006).

Piretrin ve piretroidlerin toksisite mekanizması ile ilgili en önemli bir üstünlükleri ise memelilerde böceklerden daha düşük toksisiteye sebep olmalarıdır. Böceklerde memelilerden 2250 kat daha zehirlidir. Bu sinirsel zehirlerin omurgalı ve omurgasızlar arasındaki güçlerindeki farklılıklar detoksifikasyonun farkından

kaynaklanmaktadır. Sinirsel sodyum kanallarının omurgasızlarda piretroidlere duyarlılığı memelilerden on kat daha fazladır. Böceklerde piretrin ve piretroidler yeterli dozda verildiğinde hızlı yere serici ve güçlü paralitik zehirlenme nedeniyle öldürücüdür (Narahashi vd. 1995).

Dünya çapında yıllık kullanılan piretroid aktif bileşen miktarı Şekil 2.9'da gösterilmektedir (FAOSTAT 2013). Dünya'nın bölgesine bağlı olarak, tarım, halk sağlığı, veterinerlik ve tıbbi uygulamalar için sayısız üründe kullanılan bir düzineden fazla kayıtlı piretroid molekülü vardır. Spesifik piretroidler şunlardır; allethrin, biyoallethrin, bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, d-fenothrin, esfenvalerat, fenvalerat, fenpropathrin, flumethrin, fluvalinat-tau, lambdacyhalothrin, permethrin, prallethrin, resmethrin, tefluthrin ve tetramethrin.



Şekil 2.9. 1990'dan 2013'e kadar Dünya çapında yıllık piretroid aktif bileşen kullanımı (FAOSTAT 2013)

Sentetik piretroidler (SP'ler) Dünya Sağlık Örgütü tarafından orta derecede tehlikeli olarak sınıflandırılmaktadır (Sınıf II) (WHO 2009). Piretroidlerin kullanımı son yirmi yılda artmıştır ve buna karşılık çevre, ev ve beslenme insan maruziyeti için fırsat olmuştur. Emilen piretroidler hızla metabolize edilir ve vücuttan atılır. Her bir piretroidin kendine has bir kinetik profili olmasına rağmen, genel olarak piretroidlerin plazma yarı ömrü 8 saatten azdır (Kim vd. 2008; Godin vd. 2010; USEPA 2013a).

Her yıl, sanayi ve tüketici uygulamaları için yaklaşık 4,6 milyon ton pestisit kullanılmaktadır. Bu geniş kimyasal bileşikler, hava, toprak ve suya dağılır, bu da insanlar gibi hedef dışı organizmaların maruz kalmalarıyla sonuçlanır (Barr vd. 1999; Zhang vd. 2011). Çiftçiler, bu kimyasalların karıştırılması, yüklenmesi ve uygulanması,

ekinlerin toplanması ve işlenmesi gibi bazı tarımsal operasyonlar sırasında genel nüfusa göre daha yüksek seviyelerde tarım ilaçlarına maruz kalmaktadır (Atreya vd. 2012). Lösemi, non-Hodgkin lenfoma ve multip l miyelom gibi belirli kanserler için bildirilen oranlar tarım işçileri için dikkate değerdir ve pestisitlere mesleki maruziyetle ilişkilidir (Tumer vd. 2016).

Piretroid pestisitleri çevreyi kirletme bakımından geleneksel olarak kullanılan pestisitlerle kıyaslandığında daha hızlı parçalanması ve etki özgüllüğü nedeni ile çevresel olarak daha avantajlıdır. Buna rağmen gıda zincirleri vasıtasıyla farklı hedef dışı organizmalara kadar ulaşarak benzer sistemleri kullanan organizmalarda istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir (Zhao 2014).

Piretroidlerin lipofilitesi nedeniyle, bir organizmaya girdiklerinde onları çıkarmak zordur. Piretroidlere uzun süreli, düşük dozda maruz kalma kronik hastalıklara neden olabilir ve organizmaların sinir, bağışıklık, kardiyovasküler ve genetik sistemleri üzerinde toksik etkilere neden olabilir, teratojenisite, karsinojenisite ve mutajeniteye neden olur (Ma 2009; Koureas vd. 2012).

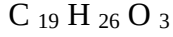
Zeljezic ve Garaj-vrhovac (2001) yaptıkları çalışmada pestisit üretiminde kullanılan deneklerde periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı ve DNA onarımının derecesini değerlendirmek için kromozomal aberasyon analizi ve alkalik tek hücre jel elektroforezi (Komet) testi kullanmışlardır. İşçilerdeki olası primer genotoksik etkileri belirlemek için, kan örneklerini, karmaşık bir pestisit karışımına 8 aylık bir süre maruz kaldıktan sonra almışlardır. Pestisitlerin bir karışımına yüksek maruz kalma süresinden sonra, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti açısından, komet testindeki DNA hasarının düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını bulmuşlardır.

Piperakis vd. (2006) çalışmalarında Güney Doğu Macaristan'da tarım çiftliğinde yıl boyunca seralarda sebze yetiştirme işçisi olarak çalışan pestisitlere maruz kalan kişilerde DNA hasarını insan lenfositlerinde Komet testi ile araştırmışlardır. Komet testi sonuçlarının analizi kontrol grubu ile orta ve yüksek dozda pestisitlere maruz kalan kişiler arasında bazal DNA hasarında önemli farklılık olmadığını genetik hasarın önemli bir indüksiyonunu ortaya çıkarmadığını göstermişlerdir.

El-Demerdash (2011) çalışmasında sıçan beyinde organofosfat ve piretroid insektisitlerine maruz kalmanın sonucunda lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve asetilkolinesteraz aktivitelerini araştırmıştır. İnsektisitlerin farklı konsantrasyonlarını 0, 0.1, 1, 10, 100 ve 1000 mM belirledikleri zaman aralıkları 0, 30, 60, 120, 180 ve 240 dakikada beyin homojenatı ile birlikte 37°C'de inkübe etmiştir. Elde ettiği sonuçun konsantrasyona bağlı olarak arttığını gözlemlemiştir. Sonuçta kullanılan insektisitlerin sıçan beyinde anlamlı oksidatif hasara neden olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Bu pestisitlere maruz kalmanın antioksidan savunma sistemi ile ilişkili olmasının toksisitede belirteç olarak kullanılabileceğini de belirtmiştir.

2.11. S-Bioallethrin

2.11.1. Moleküler formülü

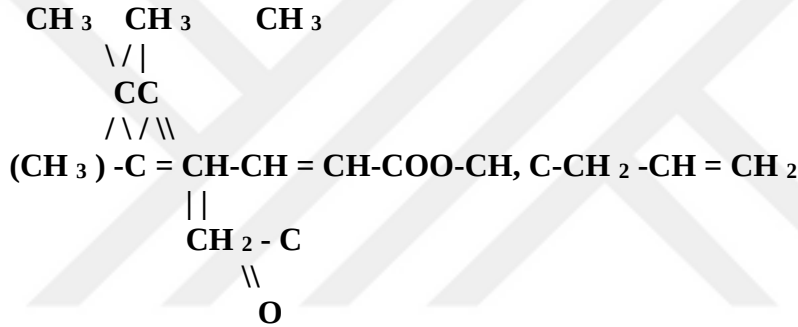


2.11.2. Kimyasal adı

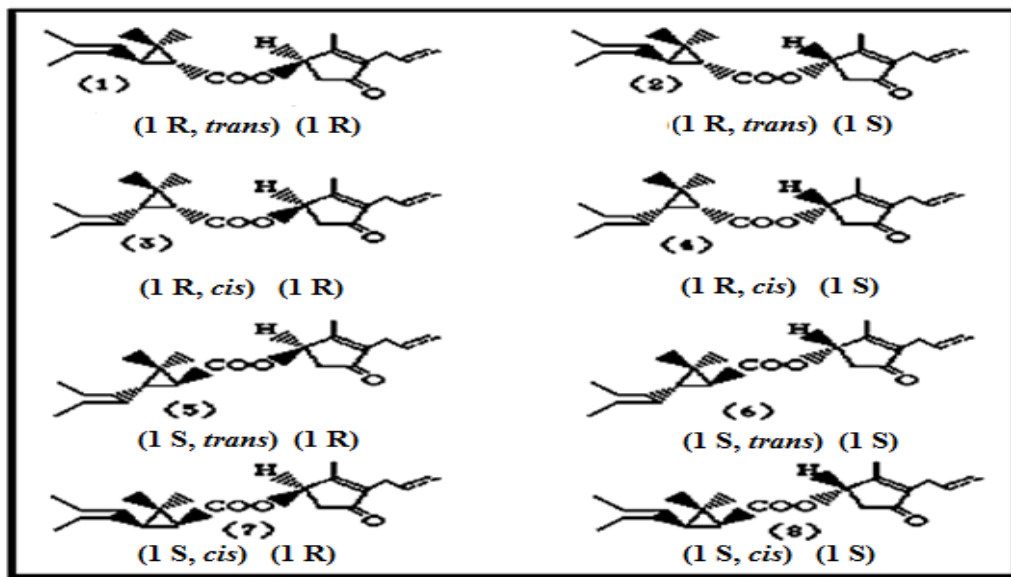
(1R, *cis*, *trans*) -2, 2-dimetil-3- (2, 2-dimetilvinil) -siklo-3,4,5,6 ve propanekarboksilik asit (krizantemik asit).

2.11.3. Kimyasal yapı

Sekiz stereoizomeri bulunan S-Bioallethrin kimyasal yapısı ve stereoizomerleri Şekil 2.10'da gösterilmiştir.



S-Bioallethrin (S)-3-allyl-2-methyl-4-oxocyclopent-2-enyl (1R, 3R)-2, 2-dimethyl-3-(2-methylprop-1-enyl) cyclopropane carboxylate,



Şekil 2.10. S-bioallethrin 8 izomerli kimyasal yapısı (Inchem 2018)

2.12. S-Bioallethrin Toksisitesi

Allethrin, 1949 yılında sentezlenen ilk sentetik piretroiddir ve 1952 yılında piyasaya sürülmüştür. Krizantemik Asit (KA), 2, 2-dimetil-3 esteridir. Özgül ağırlığı 25 °C'de 1.005 olan S-Bioallethrin kokusuz, koyu sarı renkli ve yapışkan bir sıvıdır. Allethrinler; allethrin, d-allethrin, bioallethrin ve S- bioallethrindir.

Allethrin sekiz stereoizomerin karışımıdır. Bioallethrin ise iki allethrin izomerinin karışımıdır ve rasemik karışımlardan daha etkindir. Bioallethrin, yaklaşık 1/1 oranındaki (1R, trans; 1R) + (1R, trans; 1S)'den oluşmuştur. Bioallethrin düşük su çözünürlüğüne sahiptir ve yağda çözünen bir bileşiktir. Nötral ve hafif asidik koşullarda hidrolize dayanıklıdır. Ancak normal koşullar altında kolayca hidrolize olur. Güneş ışığına karşı dayanıksızdır. Tehlike sınıflandırmasına göre Bioallethrin Dünya Sağlık Örgütü tarafından Sınıf II, yani orta derecede tehlikeli gruba dahil edilmiştir (Mercan 2007).

Allethrin bir Tip I piretroiddir. Tip I sendromu, memelilerde hiperaktivite, titreme, konvülsiyon ve felç içerir. S-bioallethrin özelliklerinden biri piretrumlar gibi düşük miktardaki dozlarda bile etki spektrumları geniş kontakt insektisit olmalarıdır. Bioallethrin ve allethrin grubunda bulunan sentetik piretroitler evdeki sinek ve sivrisineklerin kontrolü, çiftlik hayvanları üzerinde uçan ve sürünen böcekler, köpekler ve kediler üzerinde pire ve keneler için kullanılır. Tek başlarına veya sinerjistler (örn. Piperonil bütoksit ve N- octilbisikhepten dikarboksimid) veya başka insektisitler (örn. Fenitrothion) ile birlikte kullanılır (Inchem 2018).

Bioallethrin ve allethrinlerin diğer türleri metabolizma yönünden hızlı ve karaciğerde oksidasyonla ayrıca esterazlarla hidroliz edilmeleri sonucu metabolize edilirler. Genelde metabolik proses kompleks yapıda ve oluşan metabolitleri inaktif halededir. Bioallethrinlerin dokularda birikme yetenekleri yoktur (Şener ve Yıldırım 2000).

İnsanların allethrinlere inhalasyon yoluyla maruz kalması genelde aerosol spreyler, elektrikli mat ve sivrisinek kovucu spiraller gibi ev uygulamaları ile olmaktadır. Özellikle bioallethrin ve diğer allethrin içerikli kimyasalların sivrisinek kovucu matlarda kullanılması ile gece boyunca maruz kalınmaktadır. Direkt solunum yoluyla vücuda alınan piretroidlerden bioallethrin ilk olarak akciğerde istenmeyen etkiler oluşturmaktadır. İnhalasyon yoluyla bioallethrine maruz kalma sonucu oluşan maruziyet solunum yolunun irritasyonu ve bazı semptomlara neden olmaktadır. Formülasyondaki farklı oranlarda bulunan stereoizomerler nedeniyle bioallethrinler semptomların sıklığı ve şiddetini değiştirebilirler (Mercan 2007).

McCavera ve Soderland (2012) yaptıkları çalışma ile S-bioallethrininde aralarında bulunduğu tefluthrin ve deltamethrin piretroidlerin *Xenopus* oositlerinde

Nav1.6Q3 sodyum kanallarının akım uzunluklarında meydana getirdiği modifikasyonları değerlendirmişlerdir. Tefluthrin ve deltamethrin ile yapılan modifikasyonları kısa depolarizasyonlardan sonra açıkça tespit etmişler ve uzun depolarizasyonlarla arttığını gözlemlemişlerdir. Aksine, kısa depolarizasyonları takiben S-bioallethrin'in modifikasyonu, uzun süreli depolarizasyon ile değiştirilmemiş olduğunu gözlemlemişlerdir. Tan ve Soderlund (2010) çalışmalarında *Xenopus laevis* oositlerinde sıçan Nav1.6 sodyum kanallarını iki elektrotlu voltaj kelepçesi tekniği kullanılarak ifade edilen sodyum akımları üzerinde piretroid insektisit S-bioallethrin kaynaklı kuyruk akımları depolarizasyon süresiyle değişmediğini, Deltamethrin ve Tefluthrinin değiştirdiğini gözlemlemişlerdir. Bu sonucun, S-bioallethrin'in, bu bileşikle Nav1.6 kanallarının kullanıma bağlı modifikasyonunun eksikliğinden dolayı açık kanallara daha fazla bağlanmamasını sağladığını gözlemlemişlerdir.

Symington vd. (2011) yaptıkları çalışmada S-bioallethrin, cismethrin, cypermethrin, deltamethrin ve fenprothrin piretroidlerinin karışımlarını izole edilen sıçan beyin sinaptozomlarında, Ca^{+2} salınımı üzerindeki etkilerini ve depolarizan koşullar altında sonraki glutamat salınımını değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar ile piretroidlerin, sıçan beynindeki presinaptik sinir terminallerinde ortak bir toksisite oranını paylaşmadığını, voltaj duyarlı kalsiyum, klorid ve sodyum kanalları dahil olmak üzere çoklu hedef bölgeleri etkilediğini göstermektedirler.

Kim vd. (2005) yaptıkları çalışmada Dünya çapında yaygın olarak kullanılan 7 adet piretroid insektisitlerin (bioallethrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerat, permethrin, sumithrin ve tetramethrin) insan meme kanseri hücrelerinde MCF-7 BUS östrojenik aktivitelerini ve bağlanma rekabetlerini bunun yanında insanda östrojen reseptörü (ER) protein ve pS2 mRNA seviyelerini sumitrinin doza bağımlı arttırdığını diğer altı pestisidin etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Go vd. (2011) çalışmalarında MCF-7 insan meme kanserine hücre çizgisini ve son sentez pS2 mRNA seviyelerini kullanarak allethrin ve birkaç sentetik piretroid bileşiğinin *in vitro* östrojenik potansiyelinde Allethrin dışındakilerin hücre proliferasyonu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu, allethrinin hafif bir şekilde MCF-7 hücre proliferasyonunu indüklediği, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda toksik olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda her bir piretroid bileşiğinin, birkaç hücresel yolu etkileme yeteneğinde olduğunu kanıtlamışlardır. Scollon vd. (2009) yaptıkları çalışmada S-bioallethrininde aralarında bulunduğu piretroidlere karşı aktivite gösteren sıçan ve insan sitokrom P450 izoformlarının farklı olduğunu saptamışlardır. Metabolizmada türlere özgü farklılıklar piretroidlerin detoksifikasyonuna neden olabildiğini bunda sonuçta farklı nörotoksik sonuçlara neden olabileceğini kanıtlamışlardır.

Gupta vd. (2013) çalışmalarında insan kornea epitel hücreleri üzerinde *in vitro* yöntemle yaygın olarak kullanılan allethrinin toksisitesinin mitokondriyal yol aracılı apoptozu içerdiğini ve bu durumun insan kornea epitel hücreleri için toksik olduğunu ortaya koymuşlardır. Madhubabu ve Suresh (2017) yaptıkları çalışmada yetişkin erkek

ratlarda 60 gün boyunca 25-150 mg / kg vücut ağırlığına göre allethrin uygulaması yapmışlar ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini spermatogenezini ile sperm fonksiyonunu etkilediğini göstermişlerdir.

Liu vd. (2006) yaptıkları çalışmada S-bioallethrin ile maruz bırakılan normal insan lenfositlerindeki değişiklikler ışık mikroskobu, akış sitometrisi, elektron mikroskobu, DNA merdiveni ve mikrodizi teknikleri ile incelemelerinde lenfositlerin S-bioallethrin maruziyetinden sonra apoptoza maruz kaldığını göstermiş ve bunun da 346 genin ekspresyon değişiklikleri ile olduğunu kanıtlamışlardır. Sonuçta S- bioallethrin'in normal insan lenfositlerinin apoptozunu ve gen ekspresyonunu indükleyebildiğini gözlemlemişlerdir.

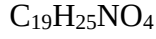
Hossain vd. (2008) yaptıkları çalışmada sıçanların hipokampusundeki glutamat ve gamma-aminobutirik asit (GABA)'nın ekstraselüler düzeyi üzerindeki etkilerini allethrin (tip I), sihalothrin (tip II) ve deltamethrin (tip II), hipokampusta glutamaterjik ve GABA'nın nöronlar üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Saito vd. (2000) yaptıkları çalışmada üç *in vitro* analiz paketi kullanılarak insan estrogen reseptörü alfa (hER alfa) piretroid insektisitlerin (d-trans-allethrin, cypermethrin, empenethrin, fenvalerat, imiprothrin, permethrin, d-fenothrin ve prallethrin) östrojenik ve antiöstrojenik aktivitesini çalışmışlardır. hER alfa aracılı gen aktivasyonunu belirlemek için bir memeli hücresi bazlı lusiferaz raportör gen testi, geliştirmişlerdir. Tüm analizlerde östrojenik maddelerin (E2 / östradiol, dietilstilbestrol ve p-nonilfenol) önemli ($p < 0.05$) olumlu etkilerini tespit etmişlerdir. Bir antiöstrojen, 4-hidroksitoksifen, E2 aracılı transaktivasyonu ve hER alfa bağlanması yoluyla hER alfa ve TIF2 arasındaki etkileşimini önemli ölçüde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Test edilen piretroidlerin hiçbirinin, *in vitro* klasik hER alfa aracılı aktivasyon yolağına etki etmediklerini ve östrojenik, antiöstrojenik etkiler gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Eriksson ve Fredriksson (1991) yaptıkları çalışmada piretroidlerin neonatal fare beynindeki muskarinik kolinerjik reseptörlerinin (MACHR) etkilerinin analizine göre bioallethrin ile deltamethrin alan farelerde, serebral kortekste MACHR yoğunluğundaki bir düşüşe doğru bir azalmanın olduğunu ve hem bioallethrin hem de deltamethrin ile tedavi edilen farelerde spontan motor davranışta önemli bir artış olduğunu saptamışlardır.

Ginsburg ve Narahashi (1999) çalışmalarında sıçan dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerinde piretroid insektisit allethrinin t Tetrodotoksine dirençli (TTX-R) Na (+) kanalları, tetrodotoksin duyarlı (TTX-S) Na (+) kanallarından allethrine daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçta allethrinin modifiye edilen kanal açıklığında herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Shehata vd. (1991) çalışmalarında farelerde piretroid insektisit bioallethrin ezolamat'ı 1-9 hafta gece boyunca inhalasyonu neticesinde meydana getirdiği değişikliklerde klinik olarak nörotoksisite ayrıca postmodern meningeslerde hemorajiyi gözlemlemişlerdir.

2.13. Tetramethrin

2.13.1. Moleküler formülü

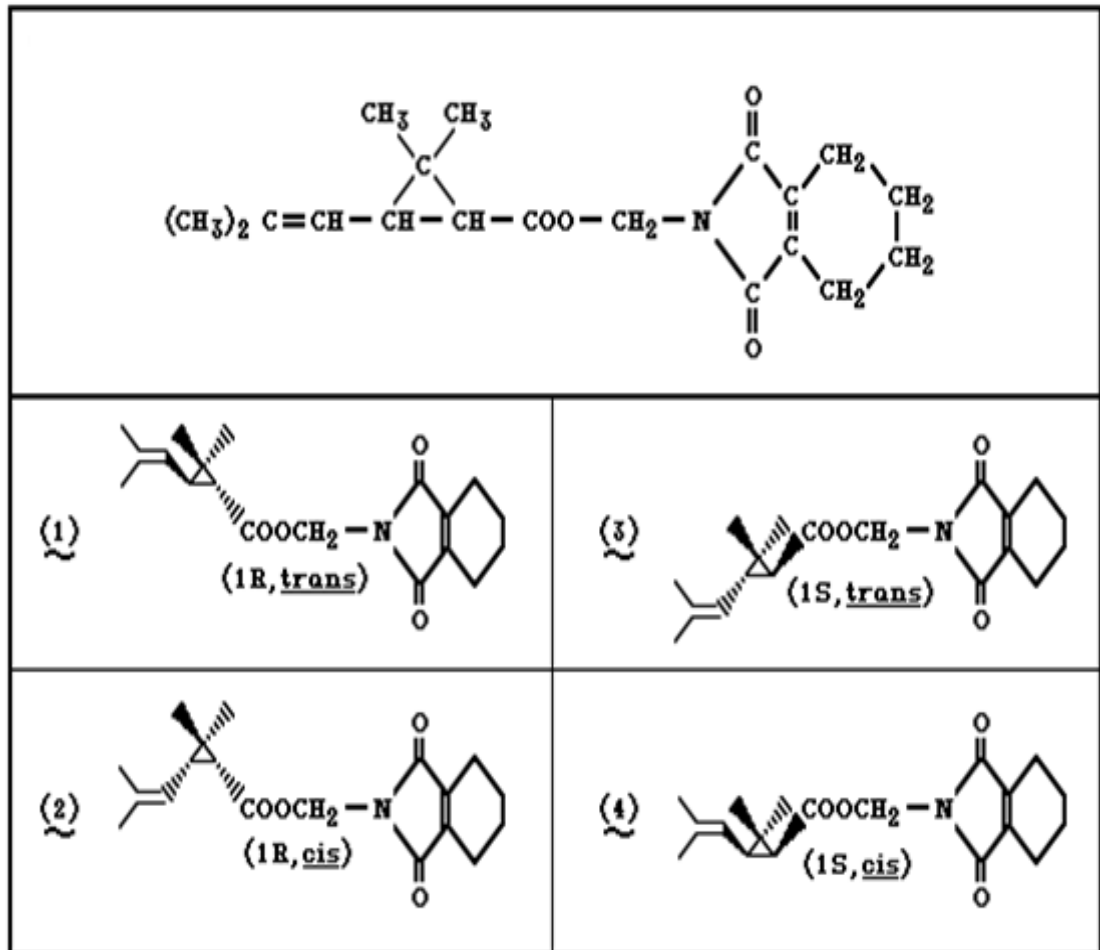


2.13.2. Kimyasal adı

(1*R*, *cis*, *trans*) -2, 2-dimetil-3- (2,2-dimetilvinil) -siklo-3,4,5,6 ile propanekarboksilik asit (krizantemik asit).

2.13.3. Kimyasal yapı

Dört stereoizomeri bulunan Tetramethrinin kimyasal yapısı ve stereoizomerleri Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Tetramethrin kimyasal yapı ve 4 stereo izomer görüntüsü (Inchem 2018)

2.14. Tetramethrin Toksisitesi

Kato ve diğerleri tarafından Tetramethrin ilk olarak 1964'te sentezlenmiş ve 1965 yılında pazarlanmıştır. Kimyasal olarak, bir chrysan esteridir. Tetramethrin renksiz bir katıdır. Isıya biraz dayanıklı olsada ışık ve havaya karşı kararsızdır. Erime noktası 65-80 °C arasındadır (Inchem 2018).

Tetramethrin tip I piretroiddir. Memelilerde tremor (T sendromu) karakteristik zehirlenme belirtisidir. Aerosol formülünde kapalı alanlarda haşare ve sivrisinekler için kullanılır. Ayrıca diğer insektisitler ve sinerjistler ile birlikte formüle edilebilmektedirler.

Sentetik piretroidlerden Tip I sınıfında bulunan ve alfa siyano grubu içermeyen Tetramethrin'e maruz kalmak sodyum kanalının kapanmasını geciktirmekte, bu da depolarizasyonun sona ermesi sırasında yavaş bir sodyum akıntısı ile karakterize edilen bir sodyum kuyruk akımı ile sonuçlanmaktadır. Bu durumun piretroid molekülü aktivasyon kapısını açık pozisyonda tutmasından kaynaklanmaktadır. Sinir impuls üretimi ve iletilmesinden sorumlu mekanizmalar temel olarak tüm sinir sistemi boyunca aynı olduğundan, piretroidler ayrıca beyin çeşitli bölgelerinde tekrarlayan aktiviteye neden olabilirler (Inchem 2018).

Endokrin bozucu bileşiklerden olan koruyucu, insektisit ve farmasötik olarak yaygın kullanılan kimyasallara insanlar dermal temas yutma ve inhalasyon yoluyla maruz kalmaktadırlar. Bu endojen maddeler hormonları etkileyerek endokrin sistem sinyallerini bozmaktadırlar. Bu durum sonucunda üreme gelişme ve bağışıklık üzerinde olumsuz etkileri büyük endişeye sebep olmaktadır (Colborn vd. 1993).

Östrojen ve androjen reseptörü yoluyla endokrin bozucu bileşikler endojen hormonların etkisini taklit ederek veya onları inhibe etmek suretiyle önemlidirler. Aynı zamanda hem hayvanlarda hem insanlarda adrenal bezin salgıladığı steroid bir hormon olan glukokortikoidlerin reseptöründe taklit etmektedirler. Glukokortikoidler, bağışıklık aktivitesinin düzenlenmesi, uygun beyin fonksiyonu ve fetal gelişim gibi çeşitli işlevlerden sorumlu olan endokrin sistemin önemli bir parçasıdır. Glukokortikoidler yaşam için gerekli olan geniş bir fizyolojik görev üstlenirler. Hayvan ve insanlarda bazal stresle ilişkili homeostazın devamı için önemli ve ayrıca büyüme üreme ara metabolizma immün ve inflamatuvar reaksiyonlar merkezi sinir ve kardiyovasküler sistemin aktivitelerinde önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle glukokortikoid reseptörünün (GR) aktivitesini modüle edebilen kimyasalların tanımlanması çok önemlidir (Clark vd. 1992; Mommsen vd. 1999; Koolhaas vd. 1999; Galon vd. 2002; Chrousos vd. 2004).

Klopčič vd. (2015) yaptıkları çalışmada geniş kullanım üretim ve biyoizleme verileri nedeniyle önemli olan dört bileşiğin Propilparaben (PP), Bütilparaben (BP), Dietilheksil Ftalat (DEHP) ve Tetramethrin (TM), glukokortikoid benzeri aktivitesini

ölçmek için endojen glukokortikoid reseptörü ve stabil olarak transfekte edilmiş lusiferaz raportör gen yapısını eksprese eden MDA-kb2 hücre hattını kullanmışlardır. Tüm kimyasalların kombinasyonlarını iki doz halinde 1 µM ve 10 nM kullanarak DEHP + TM, BP + TM, DEHP + PP + TM, BP + PP + TM, DEHP + PP, BP + PP, DEHP + BP + PP + TM olarak tek başına ve birlikte kombinasyonlarını oluşturmuşlardır. Sonuçta tüm kimyasalların glukokortoid benzeri bir aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Kolsek vd. (2014a) yapmış oldukları çalışmalarında *in vitro* deney yöntemiyle GR-bağımlı lusiferaz aktivitesini eksprese eden MDA-kb2 hücreleri hattında altı tane yapısal olarak farklı olan dokuz kimyasal (Tetramethrin, Cypermethrin, Dietil heksil ftalat ve Difenil izoftalat, Naftol AS-OL ve Dikaril peroksit, Bisfenol P, Bisfenol M ve Antioksidan 425), modülatör olarak tespit etmişlerdir. Tetramethrin ve Cypermethrin, Dietil heksil ftalat ve Difenil izoftalat, Naftol AS-OL ve Dikaril peroksit, lusiferaz aktivitesine neden olduğunu diğerlerinin ise lusiferaz aktivitesini bastırdığını göstermişlerdir.

Du vd. (2010) çalışmalarında hormon reseptörü aktivitelerini Tetramethrin’inde aralarında bulunduğu dokuz piretroid kullanarak değerlendirme yapmışlar ve tüm test ettikleri kimyasalların antagonistik etkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir. Çeşitli piretroidlerin ve metabolitlerinin çoklu hormon reseptörlerinin işlevini bozabileceğini bu bağlamda insanlarda endokrin ve üreme sistemini etkileme potansiyeline sahip olabildiğini kanıtlamışlardır. Castelanos vd. (2018) yaptıkları çalışmada duysal nöron uyarılabilirliği ve uyarının başlatılmasında, modüle edilmesinde TRESK nakavt farelerinde 2 gözenekli alan potasyum (K-2P) kanalları üzerinde Tetramethrin tarafından ortaya çıkarılan ağrı ile ilişkili davranışları ile bu kanalın aşırı nöronal aktivasyonu kolaylaştırdığını ve uyarılabilirliklerini arttırdığını göstermişlerdir.

Piretroidler, insanların yaygın olarak maruz kaldıkları ve ilaç metabolize edici enzimlerin fonksiyonel ekspresyonunu değiştirdiği bilinen kimyasal böcek öldürücülerdir. Sınırlı veriler, ilaç detoksifikasyon sisteminin kilit aktörlerini oluşturan ilaç taşıyıcılarının da piretroidler tarafından hedef alınabileceğini ileri sürmektedir. Lisa vd. (2017) çalışmalarında Allethrin ve Tetramethrin’in taşıyıcı ana ATP bağlayıcı (ABC) ve çözünen taşıyıcı (SLC) ilaç taşıyıcılarının aktivitelerine yönelik potansiyel düzenleyici etkilerini araştırmışlar ve bu piretroidlerin çok ilaca dirençle ilişkili protein (MRP) 2, göğüs kanseri direnç proteini (BCRP), organik anyon taşıyıcı polipeptid (OATP) 1B1, organik anyon taşıyıcısı (OAT) 3, çoklu ilaç ve toksin dahil olmak üzere çeşitli ABC ve SLC ilaç taşıyıcılarını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Zhang vd. (2009) yaptıkları çalışmada Zebra fish balığında iki organofosfor ve dört piretroid insektisit ile bunların 50:50 ikili karışımlarının akut toksisitenin belirlenmesini araştırmışlardır. Permethrin, Tetramethrin, Bifenthrin, Etofenproks, Diklorvos ve Phomima zebra balığı için LC50 değerlerine göre 1, 28-0,469 mg/l

olarak uygulamışlardır. İkili karışımlar 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Permetrin + Diklorvos, Permethrin + Phoxim, Tetramethrin + Diklorvos, Tetramethrin + Phoxim, Bifenthrin + Diklorvos, Bifenthrin + Phoxim, Etofenproks + Diklorvos ve Etofenproks + Phoxim'in LC₅₀ değerleri belirleyerek uygulamışlardır. 48, 72 ve 96 saatlik maruziyet için LC₅₀ değerlerine dayanarak, bu 50: 50 ikili karışımların zebrafish'e karşı toksikliği ise Permethrin + Phoxim> Permethrin + Dichlorvos> Bifenthrin + Phoxim> Bifenthrin + Diklorvos> Etofenproks + Phoxim> Tetramethrin + Phoxim> Tetramethrin + Diklorvos> Etofenproks + Diklorvos şeklinde sıralandığını göstermişlerdir. Zebra balığı üzerinde tüm piretroidlerin toksisitesinin yüksek veya çok yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Usepa (2008) çalışmada Tetramethrin'in farklı konsantrasyonlarına diyetle kronik olarak maruziyet nedeniyle karsinojenite tespiti için B6C3F1 farelerinde iki yıllık onkojenite çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda tiroid ve hipofiz bezinin mutlak ve nispi ağırlığında azalma ile en sık gözlenen tümörler hemanjiom ve hemanjiyosarkom (tüm bölgeler) ve her iki cinste de Harderian bez adenomları olarak görülmüştür. Narahashi (1996) çalışmasında piretroid Tetramethrin ile sıçan serebellar Purkinje nöronların sodyum kanallarının modülasyonunu araştırmaları ile Tetramethrin ile sodyum kanal modifikasyonunun yüzdesini arttırdığını gözlemlemiştir.

Sato ve Namara (1980b) çalışmalarında Tetramethrin'in erkek ve dişi bireyler üzerindeki ve fetuslara olan etkisini araştırmak için her bir grup başına 20 birey olacak şekilde 6 haftalık erkek Slc: SD sıçanlarına ve gebe olmayanlar için iki hafta boyunca 9 haftadan az ve 9 haftalık olmayan dişi bireylere gebe olmadan önceki iki haftadan gebeliğin 7. gününe kadar oral yolla Tetramethrin'i vücut ağırlığı doz seviyelerine göre günde 100, 300 ve 1000 mg/kg uygulamışlardır. Erkeklerin üreme kabiliyeti üzerinde herhangi bir etki görmemişlerdir. Kadınlarda hamilelik oranında değişiklik gözlememişler, ancak Tetramethrin'in cinsel döngü ve bir yumurtlama engelleyici etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir.

Pence vd. (1986b) çalışmalarında 1R *cis trans* Tetramethrin'i Sprague-Dawley CDR albino sıçanları büyüme ve üreme performansı üzerindeki etkilerini araştırmak için birbirini takip eden iki kuşağa oral olarak uygulamışlardır. Sütten kesildikten sonra F1 dişilerinde hafif safra kanalı hiperplazisi kaydetmişlerdir. Tetramethrin'in erkek ve dişi bireylerde üreme performansını etkilemediğini gözlemlemişlerdir.

Sent vd. (1986) çalışmalarında % 93,3 Tetramethrin'i B6C3F farelerinde 104 hafta boyunca günlük 12, 60, 300 veya 1500 mg /kg oral olarak verilmek suretiyle beslendiğinde toksisitesini araştırmışlardır. Vücut ağırlığında ve gıda tüketiminde azalma görmüşlerdir. Hipofiz ve tiroid, paratiroid bezlerinin mutlak ve nispi ağırlıklarının, erkekler için azaldığını, erkek farelerin mortalitesi, kontrol erkeklerinden anlamlı derecede daha düşük olduğunu ancak Tetramethrin uygulaması ile ilgili herhangi bir histomorfolojik durum gözlemlemişlerdir.

Rutter vd. (1974) yaptıkları çalışmada Tetramethrin'i oral olarak Sprague-Dawley CRCR sıçanlarına tek başına 1000, 3000 ve 6000 mg/kg doz seviyelerinde ayrıca grup başına Sprague-Dawley CRCR sıçanlarına önceden verilen F1A ile muamele edilmiş bireylere 1000, 3000 ve 5000 mg/kg birlikte 104 hafta boyunca uygulamışlardır. Birlikte ve tek başına yapılan uygulama sonucunda bireylerde hayatta kalma oranı, davranış, görünüş, hematoloji kan kimyası, idrar tahlili göz muanesi ve organ ağırlığı bakımından değerlendirmelerinde herhangi bir etki saptamamışlardır.

Hara vd. (1980b) yaptıkları çalışmada % 95, 6 saflıkta Tetramethrin'in dermal toksisitesini araştırmışlardır. Hartley erkek gine domuzlarında cilt duyarlılığı testi için Tetramethrin'i 0,5 ml asetonda hayvanların sırtına haftada üç kez olmak suretiyle 10 kez tiftik yama ile topikal olarak uygulamışlardır. 24 saat sonra ve son uygulamadan iki hafta sonrada herhangi bir alerjik reaksiyon gözlememişlerdir.

Weir ve Crews (1966) çalışmalarında 15-80 yaş aralığında erkek ve kadınlardan oluşan 200 gönüllü bireyde %1'lik Tetramethrin içeren yarı kapalı yama testinde pamuklu gazlı bez kullanılarak 4 gün boyunca ciltlerine uygulama yapmışlardır. Tetramethrin'in birincil tahriş edici olmadığı ve insan derisinin Tetramethrin'e duyarlı olmadığını kanıtlamışlardır. Sato ve Narama (1980c) Tetramethrin gebeliğin 8-18. günlerinde, hamile Japon beyaz tavşanlara uygulamışlar hafif vücut ağırlığında düşüş kaydetmişlerdir. Embriyo öldürücü yönünden her hangi bir yan etkisi ve olumsuz etkiler olmadığını görmüşlerdir.

Organizmaların piretroidlere maruz kalınması hakkında her zaman endişe vardır (Mauck vd. 1976). Karada veya ev içi amaçlı vektör kontrolü olarak uygulandığında, atmosferik birikim, nehir akıntısı ve belediye atığı deşarjları gibi süreçlerle su ortamına girebilirler. Tortullarla ilişkilendirildiğinde, piretroidlere bentik organizmaların maruz kalması tortu partiküllerinin veya interstisyel suların teması ile olabilir (Edwards vd. 1987).

Bille vd. (2017) araştırmalarında kuzey doğu İtalya veneto bölgesinde suda pestisit tayini yapmışlardır. Bir sanayi bölgesinin yağmur suyu drenajından gelen beyazımsı bir sıvının bir drenaj kanalına dökülmeye başladığı görüldüğünde, bir balık masif ölüm oranı fark edilmiş ve araştırmışlardır. Toplanan su örneklerinde, ilgili konsantrasyonlarda Cypermethrin, Permethrin, Deltamethrin ve Tetramethrin varlığını kanıtlamışlardır. Böylece yaptıkları analizler sonucunda balık ölümlerinin suda bulunan pestisitlerden kaynaklandığını kanıtlamışlardır. Araştırma mevcut vaka raporlarının az olduğu düşünüldüğünde literatüre oldukça önemli bir katkı sağlamaktadır.

Aznar Alemany vd. (2017) yapmış oldukları çalışma ile İspanyanın güneyinde alabaran denizinde Çizgili yunusların (*Stenella coeruleoalba*) karaciğerinde piretroid pestisitlerin varlığını araştırmışlardır. Yunusların karaciğerinde bulunan piretroidler örneklerin % 87'sinde ortalama toplam konsantrasyon tespit

etmişlerdir ayrıca Tetramethrin ve Permethrin'in biriken piretroid profiline en çok katkı sağladığını bulmuşlardır.

Piretroid böcek öldürücüler tarımda kullanılmasının yanında yaygın olarak insan halk sağlığında haşere kontrolleri tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle uyuz ve baş biti gibi sorunlarda piretroidler tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Piretroidlere maruziyetin en bilinen etkisi sodyum kanalları üzerinde olanıdır ancak duyu nöron uyarılabilirliği gibi kanalların üzerinde etkiside bulunmaktadır.

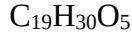
El-Akkad vd. (2016) çalışmalarında Mısırda önemli bir halk sorunu olan baş biti, *Pediculus humanus capitis*, Kasr Al Ainy hastanesinde cilt hastalıkları polikliniğine başvuran okul çocukları ve aynı zamanda bitlerden enfekte hastalardan toplamışlardır. Mısır'da yaygın olarak kullanılan standart bir pedikülit olarak Tetramethrin ve Piperonil bütoksit ile karşılaştırıldığında zeytin yağı, çay ağacı yağı, limon suyu ve ivermektin gibi bazı doğal ürünlerin pedikülit etkinliğini ayrı ayrı değerlendirmişlerdir. SEM incelemesi ile pedikülit ürünlerine maruz kalan ölü bitler, kullanılan pedikülit ürünlerine göre dışı pürüzsüz, duyu kılları, solunum spirali ve kısaçlama pençelerinde hasara neden olduğunu görmüşlerdir.

Kadala vd. (2011) çalışmalarında bal arılarında çok önemli bir işleve sahip olan antenin olfaktör reseptör nöronlarından (ORN) voltaj bağımlı sodyum akımı üzerinde Tip I piretroid sınıfı olan Tetramethrin ve Permethrin etkilerini araştırmışlardır. Tetramethrin ve Permethrinin sodyum akımını inaktivasyonunu yavaşlattığını bununda kanal açılımının uzmasına neden olduğunu ve bu bileşiklerin varlığında depolarizasyonu tespit etmişlerdir. Bal arısının ORN'lerinde sodyum kanallarının kullanımının nöronal uyarılabilirliğinin modifiye edilmesinde piretroidlerin etkilerinin güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

Fang vd. (2015) *Sarcoptes scabiei* enfeksiyonu hem insanları hem de hayvanları etkileyen bulaşıcı bir hastalıktır. Aktarım ya doğrudan temasla ya da akarların enfektif kalan birkaç gün yaşayabileceği ortamdan meydana gelir. Bu çalışmayla amaçları, *S.scabiei*'e karşı biyosit veya repellentlerin etkinliğini değerlendirmek olmuştur. Test edilen ürünler arasında piretroidler Permethrin, Esdepallethrin ve Biorezmethrin, Bifenthrin, Cypermethrin ve İmiprothrin, Sifrülin, Tetramethrin ve Sumithrin yer almaktadır. Her bir test için, tüm hareketli aşamalardan 20 canlı akar, plastik bir petri kabına konulmuş ve her bir ürün tarafından homojen bir şekilde püskürtmüşlerdir. Kontrol grubu akarlarına damıtılmış su püskürtmüşlerdir. Çalışma oda koşullarında üç kez gerçekleştirilmiş ve akarlar aralıklarla stereomikroskop altında incelemişlerdir (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 dk, 2, 3, 4, 5 ve 24 saat). Tetramethrin ve Sumithrin (A-PAR (R)) kombinasyonu hariç tüm ürünlerin 24 saat içinde tüm akarları öldürebildiğini gözlemlemişlerdir.

2.15. Piperonil Bütoksit (PBO)

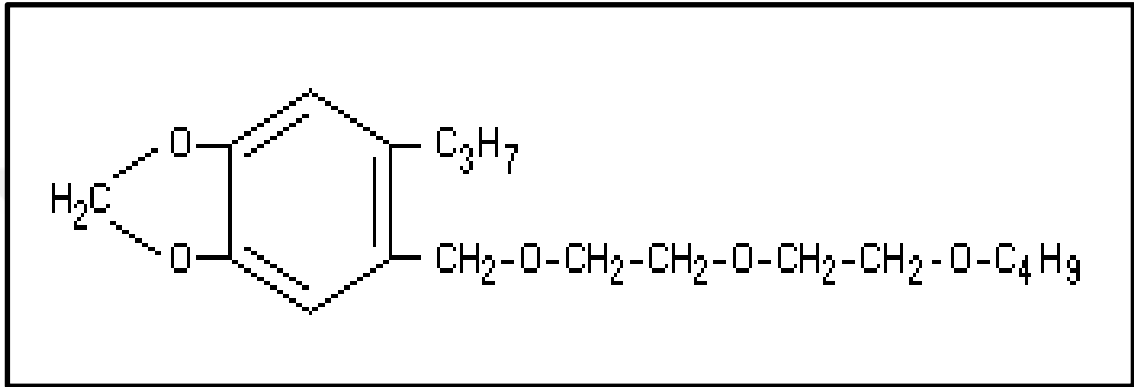
2.15.1. Moleküler formülü



2.15.2. Kimyasal adı

3,4-metilendioksi-6-propilbenzil n -butil dietileneglikol eter

2.15.3. Kimyasal yapı



Şekil 2.12. Piperonil bütoksit (PBO) kimyasal yapısı (İnchem 2018)

PBO, 1930'ların sonlarında ve 1940'ların başında, doğal olarak türetilmiş böcek ilacı piretrumun performansını arttırmak için geliştirilmiştir. PBO ilk olarak 1947'de ABD'de Herman Wachs tarafından patentlendirilmiştir. Kendi başına küçük bir intestinal insektisidal aktivite sergilemesine rağmen PBO, piretrinlerin etkinliğini artırır, dolayısıyla sinerjist olarak adlandırılır.

PBO esas olarak 3:1 ila 20:1 arasında değişen oranlarda (PBO: piretrinler) doğal piretrinler veya sentetik piretroidler gibi insektisitlerle birlikte kullanılır. PBO, sitokrom P-450 sistemini bloke ederek böceklerin doğal savunma mekanizmalarını baskılamakta, böylece de formülasyon içerisindeki diğer etken maddenin etkinliğini daha da artırmaktadır.

İnsektisit direncini kontrol etmek için, metabolik inhibitörlerin (sinerjistler) kullanımı önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Sinerjistler, belirli bir insektisit toksisitesini normalde bir organizma için toksik olmayan dozlarda arttırmak için böcek ilacıyla karıştırılır (Matsumura 2012). Piperonil bütoksit (PBO), dietil maleat (DEM) ve trifenil fosfat (TPP), en yaygın olarak kullanılan sinerjistlerdir ve sırasıyla P450, GST ve esteraazların enzimatik sistemini inhibe eder (Scott 1991).

2.16. PBO Toksisitesi

Piperonil bütoksit 1947 yılında geliştirilen hafif aromatik kokulu ve soluk sarı renkte şeffaf yağlı bir sıvıdır. Oksidatif stresin, kimyasal karsinojenizde, eksojen kimyasallara maruz kaldıktan sonra reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturduğu düşünülmektedir. Kemirgenlerde hepatokarsinogenler olduğu bilinen bazı çevresel kimyasalların metabolizması, bir redoks döngüsü veya Sitokrom P450 (CYP) indüksiyonunu içerir (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000; Umemura vd. 2006).

Böceklerdeki birçok kimyasal türünün parçalanmasındaki ilk adım, karaciğerde bulunan P450 mono-oksijenazlar adı verilen bir grup mikrozomal enzim tarafından oksitlenmesidir. PBO, bu enzimlerin aktivitesini inhibe eder ve böylelikle insektisitler dahil olmak üzere birçok tipte molekülün metabolizmasını önler. Bu, zehirli formda uzun süre kalır ve böceğe yapabilecekleri zarar miktarını artırır. PBO, organizmayı geçici olarak kolayca tolere edilebilecek çeşitli toksik kimyasallara karşı savunmasız hale getirir. Üretim, formülasyon ve çeşitli tarım dışı ve tarımsal uygulamalarda insektisit sinerjist olarak kullanılması hem işçiler hem de genel nüfus için potansiyel maruz kalma kaynaklarıdır.

Tasaki vd. (2013) yaptıkları çalışmada kimyasal maruziyetle insanlarda ortaya çıkan karsinojeniz riskini doğru bir şekilde değerlendirmek için, ROS üretildiği yolları ve ortaya çıkan oksidatif stresin etkilerini anlamak için araştırmada genotoksik olmayan olarak sınıflandırılan PBO p53-yeterlikli ve yetersiz gpt delta farelerine vermişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda farelerin PBO'ya maruz kalmasından sonra ROS oluşumunda çok önemli bir rol oynadığını göstermektedirler.

Selim vd. (1999) yaptıkları çalışmada Piperonil bütoksit (PBO) dermal toksisitesinin tayini için sağlıklı dört gönüllü genç erkekte ventral ön kolda topik uygulama yapmışlardır. Bireylere uygulamadan sonra her iki formülasyonun her biri için İpsilateral ve kontralateral kollardan kan, idrar ve dışkı, 8 saatlik uygulama sırasında ve 120 saatlik bir uygulama sonrası dönemde belirli aralıklarla toplamışlardır. PBO'nun kendi başına ya da formüle edilmiş absorpsiyonu, idrarda atılan radyoaktivitenin ve ipsilateral plazmada radyoaktivitenin gösterdiği değer çok zayıf ve emilen radyoaktivitenin idrarla hızla ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir. Çalışma sonunda deride PBO birikimi olduğuna dair hiçbir kanıt gözlemlememişlerdir.

Kawai vd. (2009) çalışmalarında farelerde Piperonil bütoksit (PBO) ile indüklenen hepatokarsinogenezin mekanizmasını açıklamayı amaçlamışlardır. Erkek farelerin üçte ikisinde kısmi hepatektomi, N-dietilnitrozamin (DEN) başlatmışlar ve % 0.6 PBO içeren besinlerle sekiz hafta beslemişlerdir. (ATF3) gibi mitojen ile aktive edilen protein kinazın (MAPK) erken yanıt veren genleri arttığını ve böylece, PBO'nun MAPK yolunu aktive edebildiği ve PBO ile indüklenen hepatokarsinogenezin erken evresinde ATF3 transkript seviyelerini artırdığını gözlemlemişlerdir.

Muguruma vd. (2009) yaptıkları çalışmada F344 sıçanlarının Piperonil bütoksit'e kronik olarak maruz kalması sonrasında reaktif oksijen aracılığı ile karsinogenesis ve hepatoselüler tümör oluşumunu araştırmışlardır. Çalışma sonunda sıçanların karaciğerinde ROS aracılı hepatokarsinogenezi indükleyen PBO'nun eşik dozunun % 0, 03 olduğunu belirtmişlerdir.

Tanaka (2003) Piperonil bütoksitin beslenme ve üreme toksisitesini çalışmışlardır. PBO 0 (kontrol grubu), % 0.01, 0.03 ve 0.09 oranlarında F (0) jenerasyonundaki fareler 5 ve 9 haftalık iken beslemişler, F (1) jenerasyonunun ve seçilmiş reprodüktif ve nörodavranışsal parametrelerini ölçmüşlerdir. PBO'nun doğumda boy, ağırlık ve cinsiyet oranı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını görmüşlerdir. Çalışma sonucunda farelerde PBO'nun doz seviyelerinin üreme ve nörodavranışsal parametrelerde bazı olumsuz etkiler ortaya çıkardığını göstermişlerdir.

Muguruma vd. (2008) çalışmalarında farelerde 24 saat boyunca % 0.6 Piperonil bütoksit uygulanması, bir AP-1 konsensüs oligonükleotidine bağlanan karaciğer nükleer proteinlerinin seviyesini arttırdığı ve bu proteinler, anti-c-Jun antikorun ile bir supershift gösterdiğini ve ek olarak, immüno blot analizi, PBO'nun uygulamadan 8 saat sonra c-Jun fosforilasyonunu indüklediğini ve 24 saatlik PBO işleminden sonra fosforile edilmiş ATF-2'nin bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Okamiya vd. (1998) çalışmalarında Piperonil bütoksit erkek F344 sıçanlarına 1, 2 ve 4 hafta boyunca 2 gün % 0.05, 0.2 ve 2'lik konsantrasyonlarda uygulamışlar ve karsinogenesis çalışması yapmışlardır. PBO ile tedavi edilen sıçanlarda hücre proliferasyonunda artış gözlemişlerdir. Bu sonuçlar, hepatokarsinogeneze PBO'nun teşvik mekanizmasının, CYP izoenzimlerini indüklemeye ve ara bağlantı hücresi arası iletişimi inhibe etme yeteneğini içerdiğini kanıtlamışlardır.

Takahashi vd. (1997) yaptıkları çalışmada Piperonil bütoksit kronik olarak maruz kalan erkek ve dişi CD-1 farelerinde karsinogenesisi araştırdıkları çalışmadan elde ettikleri veriler ile PBO'ya maruz kalan bireylerde hepatoselüler karsinomların doza bağlı olarak indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Bu nedenle PBO'nun farelerde hepatokarsinogen olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Phillips vd. (1997) çalışmalarında erkek CD-1 fareleri ve F344 sıçanlarında Piperonil bütoksit'in (PBO) subkronik ve prekronik maruziyetinin toksisitesini çalışmışlardır. PBO'nun farelerde vücut ağırlıkları üzerinde hiçbir etki göstermediğini, sıçanlarda vücut ağırlığında düşüşler olduğunu gözlemişlerdir. PBO, fare ve sıçandaki mikrozomal sitokrom P450 içeriği ve karışık işlevli oksidaz aktivitelerini indüklemiştir. PBO'nun farelerde ksenobiyotik metabolizması, hipertrofi ve hiperplazi indüksiyonu ile ilişkili olan karaciğer büyümesini üretebildiğini ve böylelikle, PBO tarafından fare karaciğerinde eozinofilik nodüllerin oluşumunu belirtmişlerdir.

Tanaka vd. (1994) yaptıkları çalışmada Piperonil bütoksitin Crj: CD-1 farelerinde gelişimsel ve üreme toksisitesini araştırmışlardır. Erken ve geç fetal ölümlerin yüksek doz gruplarında anlamlı olarak arttığını ve bu etkilerin anlamlı derecede doz ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada, PBO'nun doz seviyelerinin gelişimsel parametreler üzerinde olumsuz etkiler yarattığını göstermişlerdir. Takahashi vd. (1994) çalışmalarında % 94.3 saflıkta Piperonil bütoksiti beslenme yoluyla 12 ay maruz kalan erkek CD-1 farelerinde karsinogenisite çalışması yapmışlardır. Maruziyet sonrasında kurban edilen farelerin histopatolojik incelenmesi ile karaciğerinde lezyonları görmüşlerdir. Kistleri, yüksek doza maruz kalan hayvanların % 17'sinde de bulmuşlardır. Hepatosellüler adenomlar ve karsinomların doz artışı ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Ogata vd. (1993) yaptıkları çalışmada, ICR fareleri kullanılarak Piperonil bütoksiti teratojenisite için test etmişlerdir. Gebeliğin 18. gününde tüm fetusları uterustan çıkarmışlar ve dış görünümü ile iskelet anomalileri açısından incelemişlerdir. 9. günde verilen tüm dozlara maruz kalan bireylerde, bacaklarda özellikle de sağ ve sol ön ayaklarda V değerinin düşmesi deformitesinde azalması saptamışlardır. PBO dozuna orantılı olarak uzuvların küçülme deformitesi ve iskelet füzyonu görülen birey sayısının arttığını gözlemlemişlerdir.

Fujitani vd. (1993) yaptıkları çalışmada Piperonil bütoksitin subkronik ve prekronik maruziyetinin sıçanlarda karaciğer ve böbreklere olan etkisini araştırmışlardır. Histopatolojik olarak incelenen karaciğer ve böbreklerde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış gözlemlemişlerdir. Karaciğer değişiklikleri oval hücre proliferasyonu, safra kanalı hiperplazisi, tek hücre nekrozu, hepatositlerin genişlemesi, hepatosit çekirdeklerinin genişlemesi ve sıçanlarda anisonükleoz görmüşlerdir. Böbreklerde üre azot seviyelerinin arttığını ve tüm tedavi gruplarında tübüller, hücre infiltrasyonu ve fibrozis dilatasyonu meydana geldiğini kanıtlamışlardır.

Goldenthal (1993a) yaptığı çalışmada sekiz hafta boyunca erkek ve dişi iki beagle köpeğini içeren gruplara % 90.78 saflıktaki Piperonil bütoksiti (PBO) 500, 1000, 2000 ve 3000 ppm olarak hazırlayarak beslenme yoluyla maruz bırakmıştır. Maruziyetin sonlanmasından sonrada tüm doku ve organlarda incelemeler yapmış ve mikroskopik olarak incelemiştir. 2000 ppm üzerindeki bireylerde gıda tüketiminin azaldığını ve fosfataz aktivitelerinin, nispi karaciğer ve safra ağırlıklarının artmış olduğunu gözlemlemiştir.

Burgat vd. (1992) çalışmalarında Piperonil bütoksit'in CBA farelerinde akut maruziyetinin toksisitesini araştırmışlardır. Çalışmada 4ww altı dişi CBA farelerine PBO'nun 600 mg dozunu enjeksiyon olarak vermişler ve 3 saat sonra her fareye (14) C-dimetilnitrozamin enjekte etmişlerdir. PBO maruziyetinden sonra fareleri 4, 8, 12 ve 24 saat sonra incelemelerinde bu çalışma ile DNA metilasyonunun 4 saatte maksimum değere ulaştığını ve PBO'nun DNA onarımı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını

göstermektedirler. Schüller ve McMahon (1985) çalışmalarında Suriye hamsterına dokuz hafta tek başına Piperonil bütoksit ve N-nitrosodietilamin ile uyarılmış akciğer ve trakea tümörleri için antikarsinogenik bir ajan olarak test etmişler ve sonuçta herhangi bir grupta büyüme hızında ve mortalitede fark bulmamışlardır. Bu koşullar altında kanserojen etki göstermezken, N-nitrozodietilamin kaynaklı akciğer karsinogenezini tamamen inhibe etmiş ve trakea tümörlerinin insidansını % 50 oranında azalttığını gözlemlemişlerdir ve bu etki önemlidir.

Suzuki vd. (2010) çalışmalarında sıçanlarda Wy-14,643 ve Piperonil bütoksit *in vivo* karaciğer genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi için iki haftalık bir oral uygulama yapmışlardır. Bu kimyasallar, genotoksik olmayan bir karsinojen sınıfına aittir, ancak reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif strese bağlı DNA hasarı, bu kimyasallara verilen kemirgenlerde şüphelenmişlerdir. WY veya PBO'nun 14 gün boyunca tekrar tekrar oral uygulamaya tabi tutulan sıçanların karaciğerlerinde DNA-zarar verici potansiyele sahip olup olmadığını karaciğer KOMET testi ile, kısmen hepatektomize edilmiş sıçanlarda bu çalışmanın sonuçlarında, PBO'nun değil, WY'nin sıçanların karaciğerlerinde bazı DNA hasarlarına neden olduğunu göstermektedirler. Çetin vd. (2009) yaptıkları çalışmada larva *A. persicus*'a ve larva *Rhipicephalus turanicus*'a karşı Tetramethrin'inde aralarında bulunduğu insektisitlerin akarisisidal etkisini araştırmışlardır. Tüm keneleri kimyasallar ile muamele edilen seramik karolarda mortalite tespiti için 15 dakika, 1, 6 ve 24 saat maruz bırakmışlardır. Tüm uygulamalarda iki kene türüne karşı mücadelede piretroidler ve organik fosfor akarisitlerinin kullanımının yarar sağlayabileceğini kanıtlamışlardır.

2.17. Genetik Toksikoloji ve Genotoksikoloji Testleri

Toksikoloji sözcük anlamı olarak “zehir bilimi” demektir. Canlı organizmalarda zararlı etki gösteren herhangi bir madde “zehir” olarak tanımlanmaktadır. Canlıda biyolojik sistemin işlevlerinin bozulmasını sağlayarak canlının zarar görmesine ve ölümüne yol açması zehiri tanımlamak için yeterli değildir. Kimyasal bir maddenin toksik özellik göstermesi yani zehirli etkisinin olması organizmaya giren miktarına diğer bir ifade ile dozuna bağlıdır. Bu durumun önemini İsviçreli doktor ve kimyacı olan “Toksikolojinin babası” Paracelsus “Her madde zehirdir, zehir olmayan hiçbir şey yoktur. Ancak zehirle devayi (ilacı) ayıran onun doğru dozudur.” şeklinde ifade etmiştir (Vural 2005). Toksik etkinin oluşması ve zehirlenmenin ortaya çıkması için kimyasal madde veya biyotransformasyonu sonucu oluşan metabolitin belirli giriş yollarından organizmaya girmesi etki ettiği bölgede belirli bir konsantrasyonda ve yeterli sürede bulunması gerekir (Vural 2005).

Genetik toksikoloji, Deoksiribonükleik aside (DNA) verilen hasarın toksik etkilerinin incelenmesidir. DNA'da kimyasal olarak kodlanan genetik bilgi, yüksek doğrulukla ardışık nesillere korunur, çoğaltılır ve aktarılır. DNA'nın zarar görmesi

normal biyolojik işlemle veya DNA'nın doğrudan ya da dolaylı olarak kimyasal, fiziksel ya da biyolojik ajanlarla etkileşiminin sonucu olarak gerçekleşebilir (Brusick 1980).

DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır. Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadırlar (Vural 2005; Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Toksisite ve genotoksisite çalışmalarındaki önemli bir nokta, kullanılacak test sisteminin seçilmesidir. Bu bağlamda, *in vitro* yaklaşımlar tüm organizmada meydana gelenleri tamamen taklit etmediğinden *in vivo* çalışmalar daha fazla avantaj sağlar. Bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Genetik toksisite testleri genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; Ames testi, Komet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

2.17.1. Ames (*Salmonella*/ mikrozom mutajenite) testi

Ames testi, Prof. Bruce Ames tarafından 1970'lerin başında *Salmonella* mikrozom mutajenite testi, genellikle Ames testi olarak adlandırılan test geliştirilmiştir. En yaygın olarak uygulanan mutasyon testi ve genellikle tek test, çoğu kez *Salmonella typhimurium*'da ve ayrıca *Escherichia coli* bakterileri kullanılmaktadır. Kimyasalların potansiyel mutajenler ve karsinojenler olarak belirlenmesi ve toksikoloji düzenlemeleri için yaygın kullanılan bir test yöntemidir (Ames vd. 1973). Bu test, insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de sıklıkla kullanılmaktadır (Mortelmans ve Zeiger 2000; Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

2.17.2. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus testi kimyasal karsinojenleri belirlemek amaçlı bir test olarak 1950'lerde bitki hücrelerinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Haddle ve

diğerleri tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kromozom hasarının ölçülmesinde kullanılmaya başlanılmıştır (Demirel ve Zamani 2002).

MN'lar hücrede mitoz bölünme aşamasında ortaya çıkan esas olarak çekirdeğe dahil olmayan tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Hücrelerde çeşitli ajanların oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin doğrudan bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Demirel ve Zamani 2002). Mikronükleus analizi *in vitro* genotoksisite testi, genotoksik maruziyet ve etki için bir biyobelirteç deneyi olarak önem kazanmıştır. MN testi Periferik kan lenfositlerindeki (PBL) mikronükleus (MN) serbestliğinin ölçülmesi, genotoksik ajanlara maruz kalan veya genetik bir duyarlı profil taşıyan insan popülasyonlarındaki kromozom hasarının varlığını ve derecesini değerlendirmek için moleküler epidemiyoloji ve sitogenetiğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Palanikumar ve Panneerselvam 2011).

2.17.3. Komet testi (Single cell gel electrophoresis)

Komet testi, insanlarda olduğu gibi hem *in vitro* hem de *in vivo* kaynaklardan tek hücrelerde DNA hasarı değerlendirmesi için basit, hızlı ve hassas bir araç olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Komet yöntemi olarak da adlandırılan Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, birçok memeli hücresinde pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testi olarak kullanılmaktadır (Fairbairn vd. 1995; Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). *In vivo* Komet testinin avantajları, proliferasyon olmayan hücrelere ve her ne kadar genotoksisiteyi saptamaktansa herhangi bir dokudaki DNA hasarını tespit etme yeteneğidir. Komet testi için düzenlenen uluslararası çalıştayların önerileri, kuralların oluşturulmasıyla sonuçlanmıştır. Kültürlenmiş hücrelerde ve hücre dizilerinde yapılan *in vivo* Komet testi, çok sayıda bileşiğin ve çok düşük konsantrasyonlarda taranması için kullanılabilir (Bajpayee vd. 2013).

2.17.4. Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatit değişimi (KKD), morfolojik olarak kromozomda bir değişiklik olmadan, özdeş olan simetrik genetik materyallerin alışverişi sonucunda meydana gelen değişimlerdir. DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşiklerin saptanmasını sağlayan bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, deneysel çalışmalarda indikatör test olarak özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimleri araştırmak yönünden önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle kimyasalların mutajenik ve karsinojenik etkilerini belirlemek için uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Kontaş vd. 2011).

2.17.5. Kromozom anormallikleri (KA) testi

Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. KA neredeyse tamamen DNA'ya doğrudan zararın bir sonucu olan çeşitli moleküler mekanizmalar yoluyla fiziksel ve kimyasal mutajenik ajanlar tarafından indüklenir (örneğin DNA iplik kopması, baz hasarı, bazların hidrolizi, pirimidin dimerleri, DNA çapraz bağları) veya dolaylı (ör. DNA topoizomerazları I ve II'nin inhibisyonu, nükleotit havuzu dengesizliği, reaktif oksijen türlerinin oluşumu) tamir edilmeden veya kromozom kırılmaları yeniden düzenlemeler üretmek için yanlış tamir edilmesidir (Bender vd. 1974; Evans 1984). KA testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

2.18. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Drosophila SMART, bireylerin çaprazlanması sonucu oluşan transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde heterozigotluğun kaybolması ile genetik olarak meydana gelen değişikliğin fenotipe yansması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu test mitotik rekombinasyonla birlikte çeşitli mutasyonlarında oluşumunun tespit edilmesini sağlamaktadır. *Drosophila* kanat testi kimyasalların mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanabilmesi için geliştirilmiş olan bir test yöntemidir (Graf vd. 1984, 1989).

Somatik rekombinasyonun kanserde önemli bir olay olduğunu ve *Drosophila*'da geliştirilen nokta testleri dışında somatik rekombinasyon süreçlerini tespit etmek ve ölçmek için herhangi bir başka analizin olmadığını vurgulamak önemlidir. Genotoksisite çalışmalarında *Drosophila*'nın iyonlaştırıcı radyasyonun (Müller 1927) ve kimyasalların (Auerbach ve Robson 1942) DNA'ya zarar veren etkisini tespit etmek için kullanılan ilk organizma olduğu unutulmamalıdır. Herhangi bir *in vivo* testte olduğu gibi *Drosophila*'da da emilim, dağılım ve metabolizma süreçleri gerçekleşir. Bu nedenle *Drosophila*'nın metabolik aktivasyon sisteminin memelilere benzer olduğunu ve memelilerin kullanımından kaçınmak için, *Drosophila*'nın sağlık risk faktörlerini araştırmak için iyi bir alternatif organizma olarak ortaya çıktığını vurgulamak önemlidir (Zijlstra vd. 1987).

Drosophila melanogaster'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi *in vivo* test yöntemi ve ökoryatik bir organizma olan *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanıldığı bir testtir. *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi çalışılması kolay ve çabuk sonuç veren bir test yöntemi olması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından çalışmalarında tercih edilen bir yöntem olmuştur (Graf vd. 1984; Graf ve Van Schaik 1992; Kaya vd. 2002). *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, genetik hasar tespitinde hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmektedir.

Drosophila kanat SMART testinin bir avantajıda kimyasala maruz bırakılmış bireylerin % 70 alkol içerisinde uzun süre saklanabilme olanağının mümkün olması ve daimi olarak kalıcı preparat hazırlanabilme imkânı sağladığı için elde edilen sonuçların doğruluğunu saptama ve yeni bir değerlendirmeyi yapabilmeyi mümkün kılmıştır (Graf vd. 1984; Graf ve Van Schaik 1992; Kaya vd. 2002).

2.19. *Drosophila melanogaster*

1830'da Meigen tarafından tarif edilen *D. melanogaster*, Afrikada ortaya çıkmıştır. *D. melanogaster*'in Afrika dışı habitat genişlemesi ile mevcut dağılımı Dünya çapında olup her kıta ve adada bulunmaktadır. *D. melanogaster* türlerinin Dünya üzerinde başarılı bir şekilde yayılımı büyük ölçüde ekolojik nişlerinin genişliğine bağlıdır. *Drosophila*'nın çok çeşitli sıcaklıklara karşı toleransı, farklı gıda kaynaklarını kullanıyor olması kozmopolit yapısından dolayıdır. İnsanlarla arasındaki güçlü ilişki sayesinde *Drosophila*'nın sayılarının etkin bir şekilde dağılması ve yeni bir ortama girmesi mümkün olmuştur (Markow 2015).

Drosophila adı (çiğ sevgilisi), 1823 yılında İsveçli entomolog Carl Frederick Fallen tarafından tanımlanmasından sonra *Drosophila*'nın deneysel türleri ilk olarak 1933 yılında JW. Meigen tarafından tanımlanmıştır. *Drosophila*'nın kolayca kültürlendiğini ve kısa bir yaşam döngüsüne sahip olduğunu çalışmaları sırasında keşfeden entomolog CW. Woodworth ilk defa laboratuvar ortamında ürettiği *Drosophila*'nın keşfedilen bu iki özelliği iyi bir model organizma olmasındaki başarısına çok büyük katkıda bulunmuştur.

Drosophila ilk kullanılmaya başlandığı 1900'lü yılların başından itibaren günümüze kadar genetik alanındaki büyük atılımların merkezinde olmuştur. *Drosophila*'nın bir model organizma olarak genetik laboratuvarında kullanılması ilk defa 1909 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından önerilmiştir. Thomas Hunt Morgan 1933 yılında "kalıtsal kromozomun oynadığı rolle ilgili keşifleri" çalışması ile Fizyoloji veya Tıp Nobel Ödülü'ne layık görülmesi ile *Drosophila*'ya olan ilgi artmıştır (Roberts 2006; Markow 2015; Vecchio 2015).

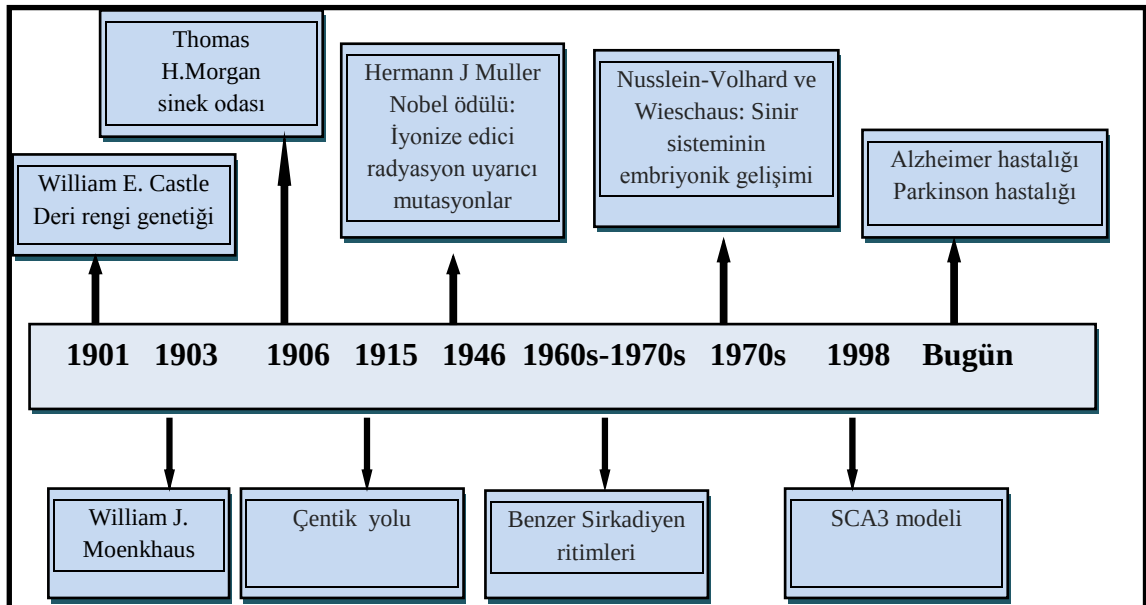
19. yüzyılda keşfedilmesiyle birlikte başlayan çalışmalarla *Drosophila*'nın bir model organizma olarak öneminin giderek daha iyi anlaşılmasını sağlaması ile 20. yüzyıl boyunca ve 21. yüzyıl boyuncada çalışmalar artarak devam etmiştir. *Drosophila*'nın sahip olduğu avantajlar, bir model organizma olarak büyük bir öneme sahip olmasını ve yapılan çalışmalarda tercih edilerek kullanılmasına katkı sağlamaktadır.

D. melanogaster sadece dört kromozomdan oluşan basit genetik yapıya sahip olması nedeniyle genetik çalışmaları için büyük kolaylık sağlamaktadır. *Drosophila* genomunun tamamı sekanslanarak açıklanan ilk çok hücreli organizmalardan biridir. Genlerin % 95'inin dört kromozomun üçünde kodlandığı yaklaşık 1300 gen

tanımlanmıştır. Kromozom sayısının küçük olması ve genom yapısının bilinmesi mutantları belirlemeyi kolaylaştırmaktadır (Graf vd. 1992).

Analizler, insan hastalıklarıyla ilişkili farklı genlerin % 77'sinin *Drosophila* sekansları ile eşleştiğini ortaya çıkarmıştır. Çalışmalar ayrıca gen ifadesi ve metabolizmasının düzenlenmesinde yer alan *Drosophila* proteinlerinin insan muadillerine yakın benzerlik gösterdiklerini göstermiştir. Ayrıca, genomik analiz insanlara önemli biyokimyasal yollarının *Drosophila* biyosentez ağlarıyla iyi bir uyumunu ortaya koymuştur. *D. melanogaster* insan hastalıklarının hayvan modellerinin oluşturulmasında giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. *D. melanogaster*'i kalp hastalıkları, zihinsel ve nörolojik hastalıklar, inflamatuvar bozukluklar, sinir sistemi bozuklukları, obezite, kanser, diyabet ve uykusuzluk hastalığı vb. insan hastalıkları ile ilişkili biyolojik süreçleri incelemek ve terapötik keşifler için ideal bir model organizmadır. *D. melanogaster* insan hastalıklarının keşfi yanında ilaçların keşfi sürecinde güçlü bir alternatifliği temsil eder (Pandey ve Nichols 2011; Markow 2015).

Müllerin 1927 yılında eşeye bağlı resesif letal mutasyon testinin bulması ile *Drosophila*'da bu testler uygulanmaya başlanmıştır. *Drosophila*'nın çalışmalarda ideal bir model organizma olarak kullanılması genom yapısının ve genetiğinin yapısı hakkında kapsamlı bilginin olması, hayat döngüsünün kısa olması, bakımının kolay ve ucuz olması, insanlarla genlerinin arasındaki homoloji bulunması *in vitro* ve *in vivo* testlerinin uygulanabiliyor olmasındandır. Bu nedenlerle keşfinden günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından çalışmalarda kullanılmış ve insan sağlığı açısından son derece önemli bilgiler edinilmesini sağlamıştır. *D. melanogaster* halen günümüzde kullanılan en değerli model organizmalardan biridir (Şekil 2.13) (Stephenson ve Metcalfe 2013).



Şekil 2.13. *Drosophila melanogaster*'in hastalık araştırmalarında kullanılması (Stephenson ve Metcalfe 2013'den uyarlanmıştır)

2.20. Normal ve Yüksek Metabolik Aktiviteye Sahip *Drosophila melanogaster*

Metabolizma "hayatın devamı için gerekli olan ve organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar" olarak tanımlanabilir (Vural 2005). Yunanca "metabole" değişme anlamına gelen metabolizma canlıların belirgin özelliklerinden biridir. Metabolik yollar ile daha büyük molekülleri daha basit bileşiklere yıkararak enerji açığa çıkmasına katabolizma, daha basit moleküllerden daha karmaşık molekülleri oluşturmak için enerji kullanılmasına anabolizma denir. Metabolizma faaliyetleri enzimler aracılığı ile gerçekleşmektedir (Klug vd. 2006).

Enzimler seçici olmadıkları için birçok kimyasalın konfigürasyonunu tanıyabilirler. Ancak bir miktar özgülükleri belirli yapıda olan kimyasal maddelere karşıdır. Metabolizmada bulunan bir enzimin yokluğu ile metabolizma kaybolmaz sadece metabolik yolun değişmesi ile etkinliğini azaltabilir. Sonuçta enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklik ile metabolizmanın başka bir enzim tarafından gerçekleşmesi organizmada meydana gelebilecek tehlikeli etkileşimler ve zehirlenmelerden korumaktadır (Yüksel 2001).

Genetik yapıdaki farklar bireyler arasındaki metabolik farklılıkların en önemli kaynağıdır. Otozomal çekinik olarak aktarılan bu farka genetik polimorfizm denilmektedir. Bu enzimlerdeki genetik polimorfizm çevresel ajanların detoksifikasyonu ve metabolik aktivasyonu arasındaki dengeyi etkiler (Kocaoğlu Cencki 2011).

P450'ler çok sayıda pestisit, herbisit, çevresel kirletici ve bitkisel toksinlerin oksidatif, peroksidatif ve indirgeyici metabolizmasında rol oynarlar (Feyreisen vd. 1989; Sundseth vd. 1990). Sitokrom P-450 enzim sisteminin her dokuda dağılımı ve gen ifadelerini oluşturan mekanizmaların özgülüğü genetik olarak belirlenir. P450 enzim sisteminin düzey ve aktivitelerini substratlar, bilginin iletimi, mRNA düzeyi gibi birçok faktörden etkilenir. *D. melanogaster*'de P450, insektisit direnciyle ilişkilidir, diğer bir deyişle, dirençli suşlar, duyarlı suşlardan daha yüksek P450 aktivitesi ve daha yüksek P450 içeriğine sahiptir. *D. melanogaster*, ökaryotlar arasında genetik analizlerde olağanüstü teorik ve pratik bir arka plana sahiptir. Bu nedenle sitokrom P-450 enzimlerinin genetiği ile ilgili çalışmalar için uygun bir organizmadır (Hällström ve Blank 1984; Prevec vd. 1992).

Normal metabolik aktiviteye (NMA) sahip bireyler sitokrom P-450 enzim sisteminin belli bir düzeyde bulunduğu canlılardır. Sitokrom P-450 enziminin organizmada azlığı metabolik aktivitenin daha düşük olmasına ve daha yavaş metabolize edilmesine neden olmakta bu durum canlının yan etkilere daha duyarlı olmasına neden olmaktadır (Graf ve Van Schaik 1992; Kocaoğlu Cencki 2011).

Yüksek metabolik aktiviteye (YMA) sahip bireyler sitokrom P-450 enzimlerinin seviyesinin yüksek oranda olmasıyla karakterize olan canlılardır. Organizmada fazla

miktarda sitokrom P-450 enziminin varlığı ise metabolik aktivitenin daha hızlı olmasını sağlamaktadır. Hibrit NORR larvaları, yüksek yapısal bir sitokrom P450 seviyesi (STD çapraz larvalarına kıyasla) ile karakterize edilir, böylece bir dizi promutajer, NORR çaprazı kullanıldığında artan genotoksisite gösterir (Graf ve Van Schaik 1992).

2.21. Ksenobiyotik ve Biyotransformasyon

Ksenobiyotik yunanca “xenos” yabancı ve “biyotik” canlılarla ilgili kelimelerin birleşmesiyle oluşan bir terimdir (Jakoby 1990). Ksenobiyotik doğal olarak üretilmeyen ya da organizmaya ait olmayan organizmada bulunması mümkün olmayan, organizmanın normal biyokimyasına yabancı kimyasal maddelerdir. Ksenobiyotik maddeler çevresel kirleticiler, endüstriyel ve kimyasal atıklar, zirai ilaçlar, besinlerde bulunan katkı maddeleri, hidrokarbonlar, bakır kurşun civa vb. ağır metaller, pestisitler, bağımlılığa neden olan bütün uyuşturucu maddeler, kanserojen olan maddeler, ilaç ve zehirler gibi her türlü kimyasal ve biyolojik maddelerden oluşmakta ve biyolojik sistem için tamamen yabancı olan maddelerdir (Özdemir 2015).

Ksenobiyotik olan kimyasal ve biyolojik maddelere maruziyet doğrudan veya dolaylı yollarla olabildiği gibi ortaya çıkma ve süresi bakımından akut ya da kronik olarak da canlıların üstünde toksik olarak tesirlere sebep oluşturabilmektedir. Bu türlü toksik maddeler genellikle maruziyet yöntemine, maruz kalınan süreye ve sıklık derecesine, maruz kalınan dozun miktarına olduğu kadar, alınan toksik maddelerin toksikokinetiğinde etkili olan gen ve enzimlerdeki çok biçimli, çeşitli ve pek çok formu olan özelliklerine görede toksik etkileri canlılarda düşük veya yüksek derecede olabilmektedir.

Ksenobiyotik veya metabolitlerinin mekanizma ile biyotransformasyonları sonucu toksisitesi azalıyor veya ortadan kalkıyorsa bu olaya “detoksikasyon veya detoksifikasyon” denilmektedir. Bazen de kimyasal maddenin biyotransformasyonu ile çok aktif ara metabolitler oluşabilmekte ve bu olaya “toksikasyon” veya “biyoaktivasyon” denmektedir (Vural 2005).

Bireylerde metabolik aktivitelerinin hızlı veya yavaş olması durumu ilaç, kimyasal vb. maddeleri metabolize etme hızları, metaboliz sonucu oluşan metabolitlerin miktarlarını bunun sonucunda etkilenme derecelerini birbirlerinden farklı oluşturacaktır. Detoksifikasyon mekanizmasının asıl amacı canlıların maruz kaldıkları çeşitli maddeleri vücuttan uzaklaştırmaktır. Yağda çözünen bileşikler biyolojik zarlardan kolaylıkla geçerler ve vücutta birikim yaparlar. Bu nedenle yağda çözünürlük bileşiğin vücuttan atılımını kısıtlar. Vücuttan uzaklaştırmanın en kolay yolu suda çözünür hale getirip idrar yoluyla dışarıya atmaktır (Kocaoğlu Cencki 2011).

İlaç metabolize edici enzimler metabolizmada merkezi rol oynamakta, ksenobiyotiklerin veya vücut içine sokulan eksojen bileşiklerin eliminasyon veya detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Meyer 1996). Genel olarak, DME'ler,

ksenobiyotiklerin çevreye ve aynı zamanda belirli endobiyotiklere karşı potansiyel zararlı maruziyetine karşı vücudu korurlar. Bu bileşiklerin neden olduğu potansiyel yaralanmayı en aza indirmek için, dokuların ve organların çoğu, bazal bollukta mevcut olan faz I, faz II metabolize edici enzimler ve faz III taşıyıcıları dahil olmak üzere çeşitli DME'lerle iyi bir şekilde donatılmıştır (Meyer 1996; Rushmore ve Kong 2002). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmaları iki fazda toplanmaktadır.

1) Faz I reaksiyonları

a-) Yükseltgenme (oksidasyon); Faz I'in en önemlisi olan bu fazda P450 olarak bilinen büyük bir enzim grubu görev yapmaktadır. Pestisitlerin daha az zehirli etkiye sahip olan ara maddelere dönüşmesinde hidroksilasyon, O-,N-,S-, dealkilasyon ile elektrofilik ya da nükleofilik maddeleri eklenmesidir.

b-) Hidroliz; İnsektisitlerin çoğu ester bağları içermekte ve bu bağlar hidrolize hassastır. Hidrolaz grubunda insektisit detoksifikasyonunda en önemli olan enzim esterazlar asit ve alkol gruplarına su molekülünün eklenmesi sonucu oluşan hidrolazlardır.

c-) İndirgenme (redüksiyon), Böceklerde kimyasallar üç tip indirgenme ile gerçekleşmektedir. Bunlar nitro redüksiyon, azo redüksiyon ve aldehit ya da keton redüksiyondur (Vural 2005; Yorulmaz ve Ay 2010).

2) Faz II reaksiyonları

Çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içermektedir. Faz I reaksiyonu sonunda fonksiyonel olan hidroksil, karboksil ve epoksidaz gibi gruplar eklenmektedir. Kimyasallarla farklı gruplar birleşince moleküler kutuplu ve daha az zehirli yapı oluşmaktadır. Faz I de lipidde ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler. Faz II de endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar.

Böceklerde insektisit direncinin biyokimyasal mekanizması fizyolojik direncin oluşmasında böcek bünyesinde bulunan, monooksijenazlar (Sitokrom P450), glutatyon s-transferazlar (GST), hidrolazlar, karboksilesterazlar, asetilkolinesterazlar (hedef bölge duyarlılığının azalması) enzimlerinin etkili oldukları bilinmektedir (Vural 2005; Yorulmaz ve Ay 2010).

3. MATERYAL VE METOT

Yapılan bu çalışmada; *D. melanogaster*'in normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinin 2 adet düşürücü etkili insektisit ve 1 adet sinerjist etkiye sahip olan kimyasala maruz kalmalarının sonucunda, genotoksik etkilerinin olup olmadığının araştırılması SMART ile araştırılmıştır.

D. melanogaster SMAR Testi fenotipde gözlenen çeşitliliğin, farklı genetik değişimlerin oluşmasına neden olan delesyon, nokta mutasyon ve kromozomlarda ayrılmama etkileri ile heterozigotluğun kaybolması esasına dayanır. SMAR Testi 1984 yılında Graf ve diğerleri tarafından Bilim Dünya'sına önerilmiştir. Testin *in vivo* olması yanında farklı genetik sonuçlarla birlikte rekombinojenik etkiyi de belirleyebilmesi önemli bir avantajdır (Kaya 2000; Marcos ve Carmona 2013).

Bu test sisteminde, transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerinin fenotipte gözlenebilmesini sağlayan *D. melanogaster* hatları kullanılmıştır. Transheterozigot larvaların elde edilmesinde *D. melanogaster*'in 3. Kromozomu üzerinde bulunan flare (*flr*³, 3-38,8) ve multiple wing hair (*mwh*, 3-0,3) belirleyici genler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler, çalışılan kimyasalların ve kombinasyonlarının potansiyel genotoksik etkilerinin direkt olarak kendisinin mi etkili yoksa metabolizma ürünleri ile mi etkili olduğunun saptanmasını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

3.1. *Drosophila melanogaster* 'in Yaşam Döngüsü

Insecta sınıfı, diptera ordosu ve *Drosophilidae* familyasına ait olan *D. melanogaster* tam başkalaşım geçiren holometabol böcekler grubunda yer almaktadır. Diploid kromozomlu ve dört çift kromozoma (3 otozom, 1 gonozom) sahiptir. *D. melanogaster* için birçok farklı isim kullanılsa da en çok bilineni ve kullanılanı meyve sineği veya sirke sineğidir (Graf vd. 1992).

Drosophila'nın genetik laboratuvar çalışmalarında kullanımı T.H. Morgan (1909) tarafından 100 yıl kadar önce önerilmiş ve günümüzde de halen genetik araştırmaları için kullanılan en ideal bir model organizmadır (George ve Shukla vd. 2011).

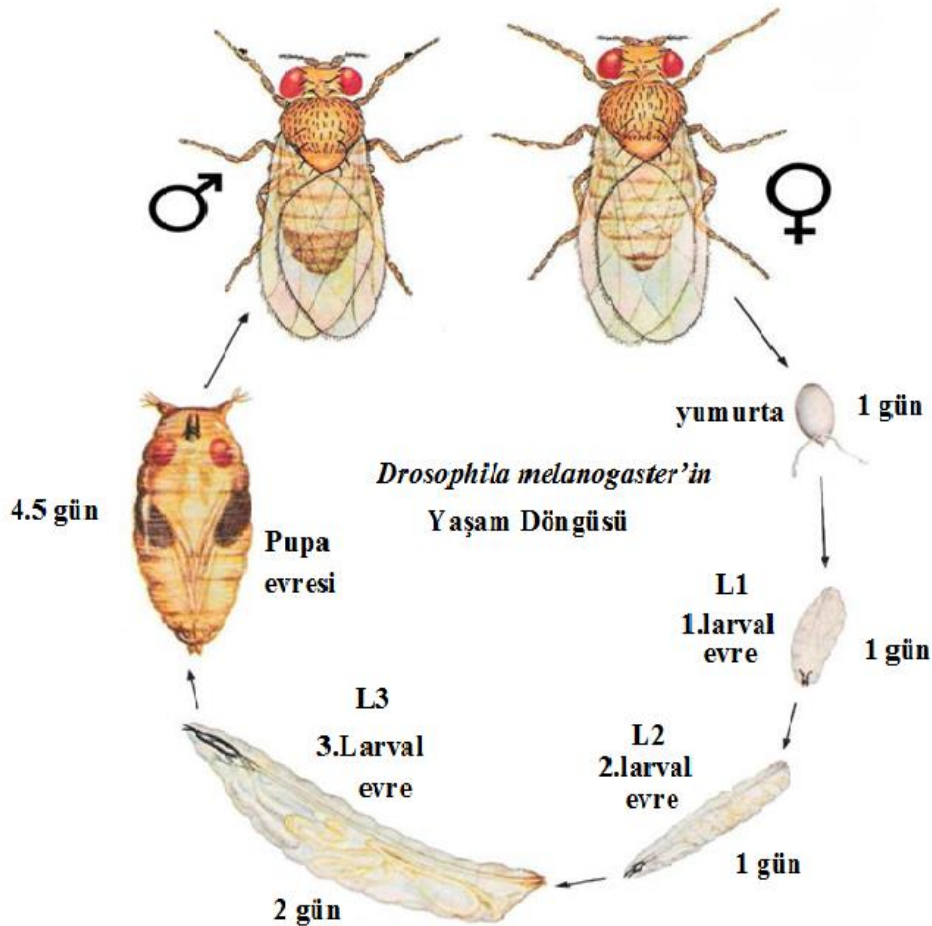
Drosophila'nın bir model organizma olarak kullanımı ve diğer bilim dallarına da dahil edilmesi tesadüfi değildir. *Drosophila*'nın kısa ve hızlı bir yaşam döngüsü ile 25°C' de 9-11 gün gibi bir süreçte yumurtadan ergin birey oluşumu ve ökaryotik bir organizma olması *D. melanogaster*'i model organizma olarak ön plana çıkarmaktadır.

D. melanogaster ile *in vivo* ortamda çalışılabilmesi, birkaç gün içinde bir çiftten yüzlerce birey elde edilebilen yüksek üreme potansiyeline sahip olması, rahat

çalışılabilirlikte büyüklükte olması beslenmesinde kullanılan malzemelerin düşük maliyetli olması, kolay bir şekilde kültüre edilebilmesi, güvenilir olması, sahip olduğu dört kromozomun genom yapısının büyük çoğunluğunun bilinmesi ve birçok mutant karakteri bulundurması gibi özelliklere sahip olması sebebiyle genetik çalışmalarında tercih edilmektedir (Graf vd. 1992; Kaya 2000; Ong vd. 2014; Veciho 2015; Alaraby vd. 2016).

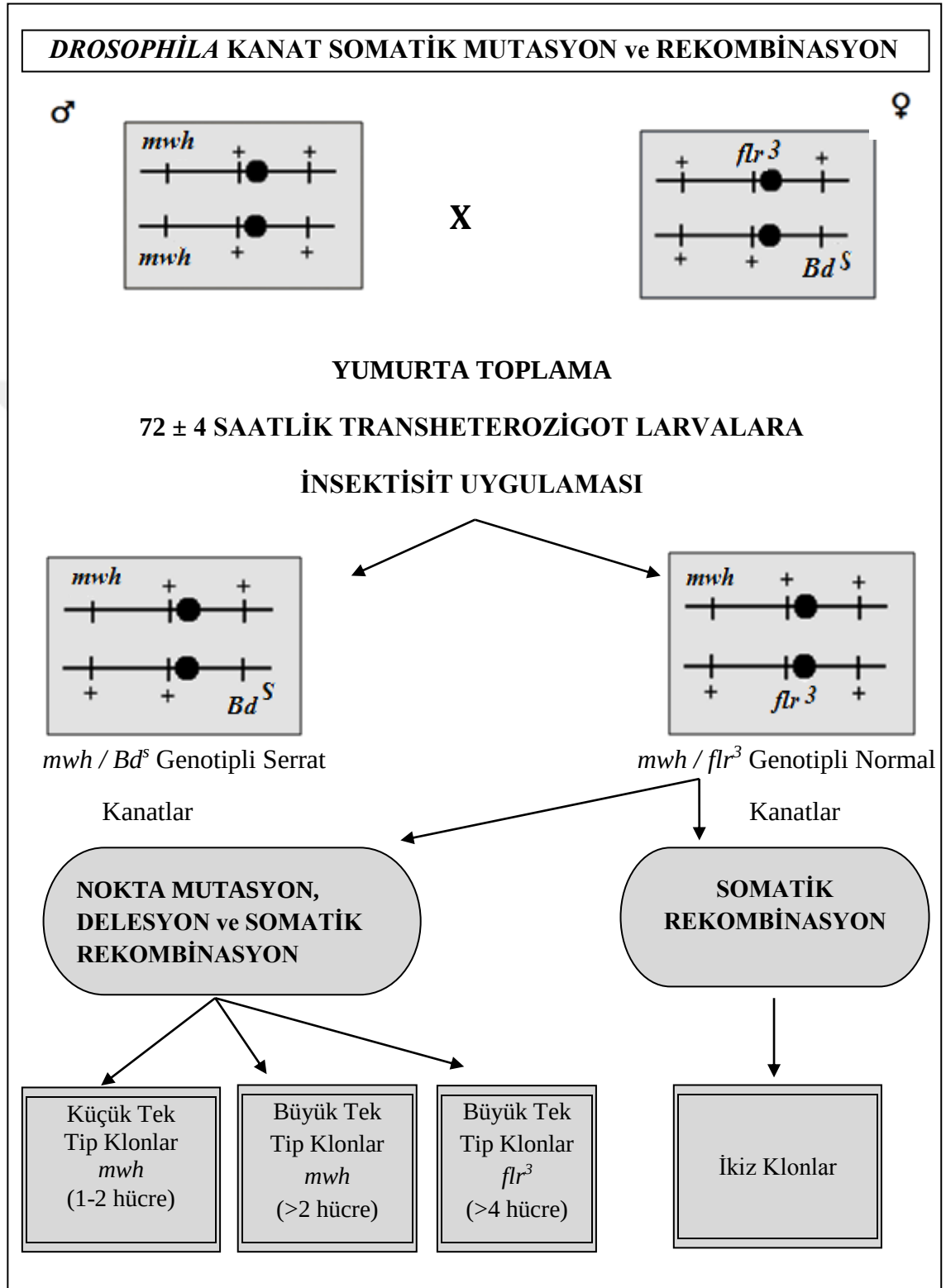
D. melanogaster'in hayat devri iki periyotta tamamlanır. Birincisi embriyonik periyot, yumurtanın döllenmesi ile başlayan ve genç larvaların çıkmasına kadar olan süreci kapsamaktadır. İkinci periyot ise post embriyonik dönemi kapsayan genç larvaların çıkmasından ergin birey haline gelene kadar olan süreçtir.

D. melanogaster 25°C ve % 60 bağıl nem bulunan optimum koşullarda yaşam döngüsünü; embriyonik gelişim evresi olan yumurta, birinci larval evre, ikinci larval evre, üçüncü larval evre, pupa evresi ve yetişkin evre olmak üzere olan 5 farklı evrelerini geçirerek 9-11 gün gibi kısa bir sürede tamamlamaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Drosophila melanogaster*' in yaşam döngüsü (Torres vd. 2011'den uyarlanmıştır)

D. melanogaster'in kanatlarında oluşan somatik mutasyon ve rekombinasyonun saptanabilmesi şematik olarak şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. *Drosophila melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi (Kaya 2000'den uyarlanmıştır)

3.1.1. *Drosophila melanogaster*'in yaşam evreleri

Drosophila'nın gösterdiği başkalaşım evreleri ve bu evrelerin süreleri 25 °C'de aşağıdaki gibidir.

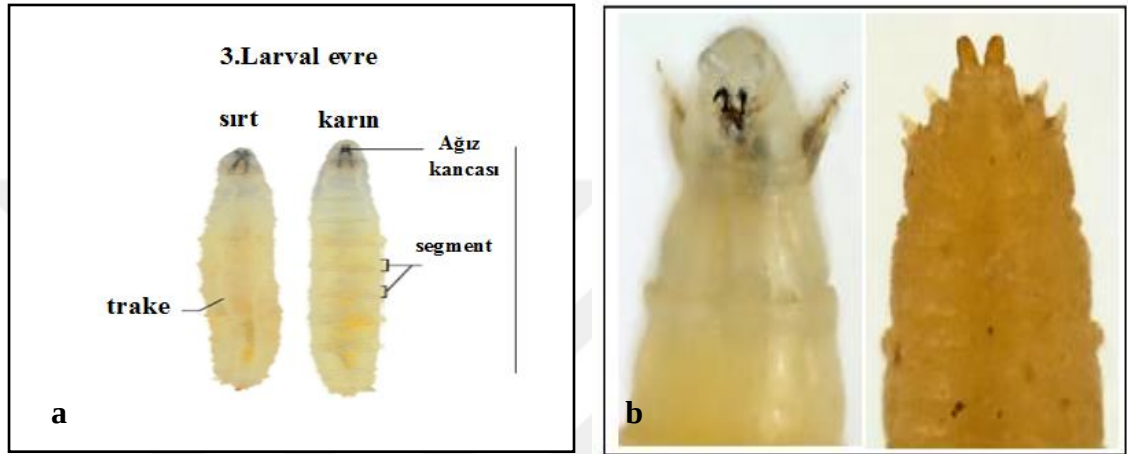
Embriyonik gelişim	: 1 gün
Birinci larval evre (L1)	: 1 gün
İkinci larval evre (L2)	: 1 gün
Üçüncü larval evre (L3)	: 2 gün
Prepupa evresi	: 4 saat
Pupa evresi	: 4.5 gün
Yetişkin evresi	: 40-50 gün

3.1.1.1. Yumurta evresi: *Drosophila* türlerinde yumurta tipleri birbirinden biraz farklıdır ancak genel yapıları birbirine benzemektedir. *D. melanogaster* yumurtaları yaklaşık olarak 0,15 - 0,2 mm çapında ve 0,5 mm uzunluğunda, oval ve yanal kısımları hafifçe düzleşmiş basık bir şekildedir. Yumurta evresi bir gün (24 saat) sürmektedir. Dişi bireyler günlük ortalama 100-400 arasında yumurta bırakabilirler. Yumurtanın iç kısmı vitellin zar dış kısmı koryon adı verilen zar ile çevrilidir. Yumurta belirgin bir şekilde kutuplaşmıştır. Anterior kısmın ucunda spermin yumurtaya girmesini sağlayan mikropil, posterior kısmında ise iki filament bulunmaktadır. Flamentler kalın dış zarın bir uzantısıdır ve gelişim sırasında gaz giriş çıkışını sağlayarak oksijen ihtiyacını karşılamakla beraber besin ortamında yumurtaların besin içine batmasını engellemektedir (Şekil 3.3) (Klug ve Campbell 1973; Graft ve Schaik 1992; Vijayalakshmi 2013).



Şekil 3.3. *Drosophila melanogaster* yumurta görüntüsü (mwkozlowski 2012)

3.1.1.2. Larva evresi: Yumurtadan çıkan genç bireyler birincil larval evresine geçerler ve devamlı beslenmek suretiyle hızlı bir şekilde büyüyerek 24 saat içinde ikincil larval evreye geçerler. Bir sonraki 24 saat içinde bireylerin büyümesi devam eder ve üçüncü larval evreye geçen larvalar 48 saat sonra larval evrelerini tamamlarlar. Birinci ve ikinci larval evrelerin her biri 24 saat üçüncü larval evre 48 saat sürmekte ve larvalar evre değişiminde iki kez büyüdükleri için kütikül tabakalarını değiştirirler. Larvaların başı özel bir yapı olan akron barındırırken arka ucu telsonu barındırır. Larvada toplamda sekiz segment bulunur ve her segmentin ventral tarafında küçük çıkıntılar bulunur (Şekil 3.4) (Graft vd. 1992; Aguala vd. 2013).



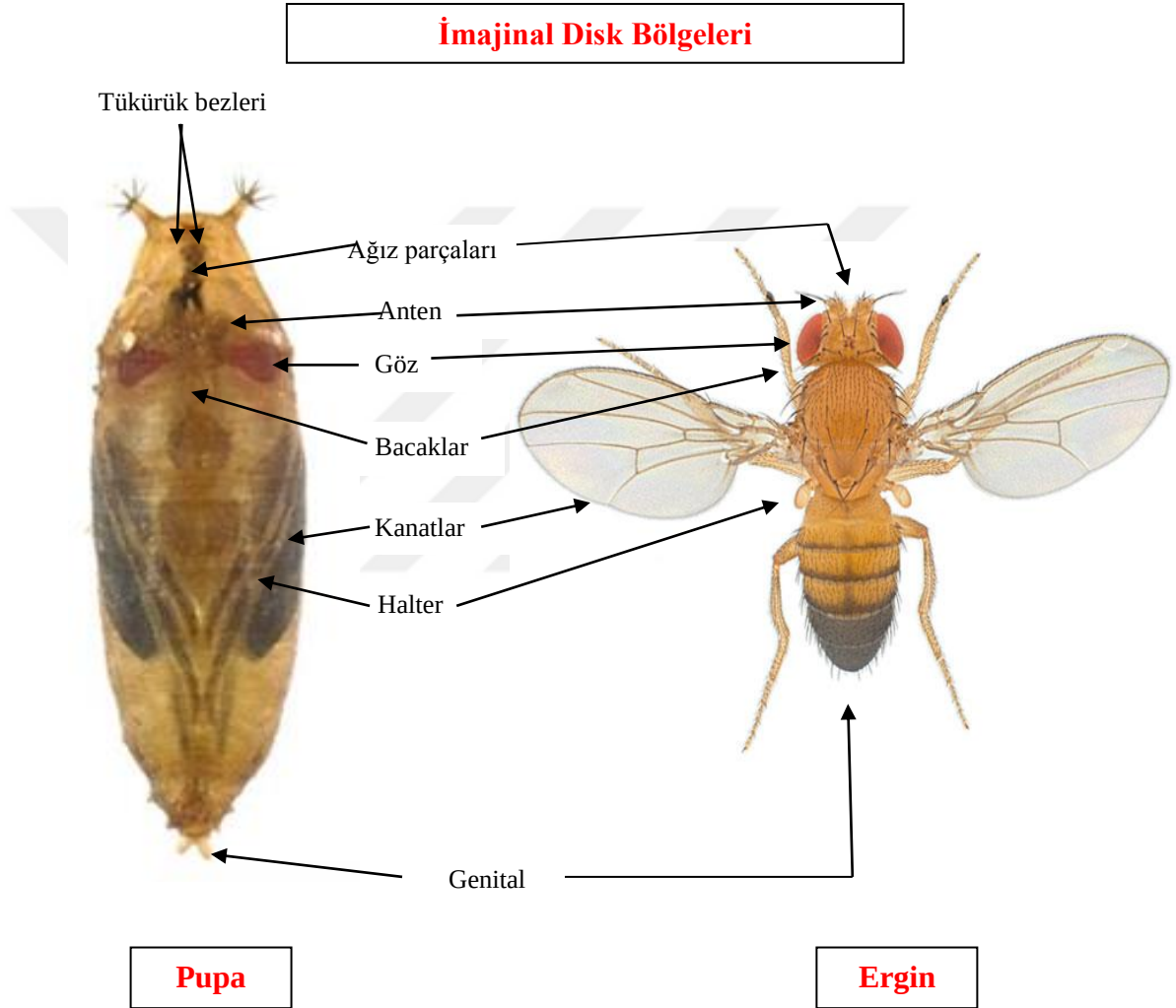
Şekil 3.4. *Drosophila melanogaster* larvasının görüntüsü; **a)** Larva; **b)** Larvanın ağız ve abdomen kısmının büyütülmüş görüntüsü (Chyb ve Gompel 2013'den uyarlanmıştır)

3.1.1.3. Pupa evresi: Üçüncü larval evre iki gün (48 saat) sonunda tamamlanmak üzere iken besin içinde bulunan larvaların besinden uzaklaşarak daha kuru ve temiz bir alana yerleşerek pupa evresine geçişleri başlar. Prepupa evresini 4 saatte tamamlayarak pupa evresine geçerler. İlk başta sarımsı beyaz bir renge sahip olan pupalar zamanla daha bir koyu renge sahip olan imoga adı verilen yapıya dönüşürler. İmoga pupa içerisinde gelişimini tam olarak sağlamış olan bireylerdir (Şekil 3.5) (Aguala vd. 2013).



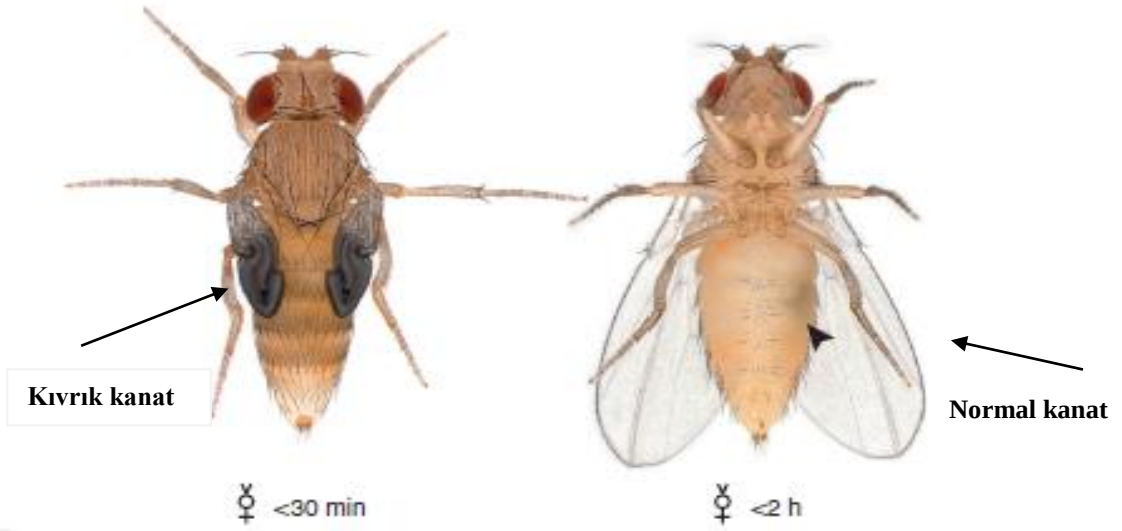
Şekil 3.5. *Drosophila melanogaster* pupa evresi görüntüsü ; **a)** Pupa; **b)** Pupanın ağız ve abdomen kısmının yakın görüntüsü (Anonim 1)

Pupa evresinde bireyler hormonların uyarılması ile metamorfoz (başkalaşım) geçirerek *Drosophila*'nın kanat, bacak ve diğer organları oluşmaya başlamaktadır. Larvada bulunan imajinal diskler hücrel blastodermden türetilen küçük bir epidermal hücre tabakasıdır ve birikimin meydana gelmesiyle her biri 4 hücre barındırır. İmajinal diskler larval evre boyunca büyür ve ebatlarını artırmak için katlanan epitelyal keseleri oluştururlar. Bunlar, metamorfoz sırasında erişkin organların gelişmesine yardımcı olur ve larva gövdesini yetişkinler üzerinde şekillendirebilmek için süreklilik sağlarlar (Şekil 3.6) (Graf vd 1992; Vecchio 2015).



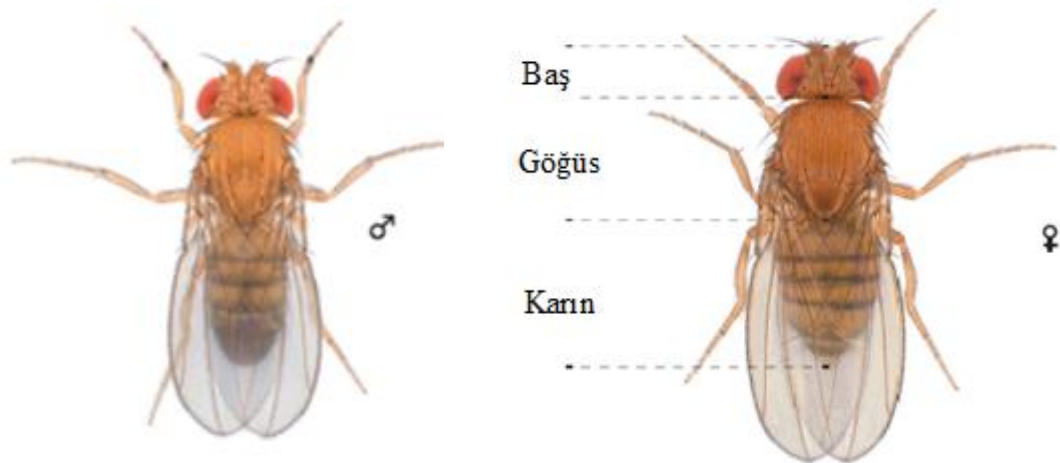
Şekil 3.6. *Drosophila melanogaster* larvalarında bulunan imajinal disk hücrelerinin erişkinde bireylerinde karşılık geldiği bölgelerin yerleri (Unv.Camb. 2015)

3.1.1.4. Yetişkin evresi: Yetişkin dişi bireyler yaklaşık 1,4 mg iken erkek bireyler 0,8 mg ağırlığında ve 3 mm uzunluğundadır. Bireyler pupadan ilk çıktıkları zaman vücutları uzun ve açık renkte, kanatlar ise henüz açılmadığı için kısa ve kıvrık bir haldedir. Kıvrık kanatlar birkaç saat içinde açılarak normal kanat görünümünü almaktadır (Şekil 3.7) (Graft vd. 1992; Vijayalakshmi 2013; Ong vd. 2014).



Şekil 3.7. *Drosophila melanogaster* kıvrık ve normal kanat görünümü (Chyb ve Gompel 2013'den uyarlanmıştır)

Erkek bireyler pupadan çıktıktan hemen sonra eşeysel olarak ergin bireyler iken dişi bireylerin eşeysel olgunluğa erişebilmeleri için 6-12 saat geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle 6 saatten önceki dönemde dişi bireylerin döllenme yeteneği bulunmamaktadır. Çalışmalarda 4 saatlik periyotlarla *flr³* döllenmemiş dişi (virgin) bireylerin seçilmesi yapılan çaprazlamanın kontrolü açısından önemlidir. Şekil 3.8'de *D. melanogaster* erkek ve dişi ergin birey görülmektedir.



Şekil 3.8. *Drosophila melanogaster* erkek ve dişi ergin birey görüntüsü (Chyb ve Gompel 2013'den uyarlanmıştır)

Standart koşulları olan 25 °C ve % 60 bağıl nem bulunan ortamda *D. melanogaster*'in yumurtadan ergin birey haline gelme süreci 9-11 gün arasında değişmektedir. Şartların değişmesi durumunda düşük sıcaklıkta yaşam döngüleri uzamakta, sıcaklığın arttığı durumlarda 30 °C ve üzeri sıcaklıkta pupa evresinde bireylerin ölüm oranları artmakta aynı zamanda dişi bireylerde yumurtlama sorunlarına neden olduğu görülmüştür. Optimum koşulları olan 25 °C'de bireylerin ömür uzunlukları 80-90 gün olarak gözlenmiştir. Sıcaklığın düşmesi veya artmasına bağlı olarak bireylerin ömür uzunlukları da değişmektedir.

3.2. Kullanılan hatların genetik yapısı

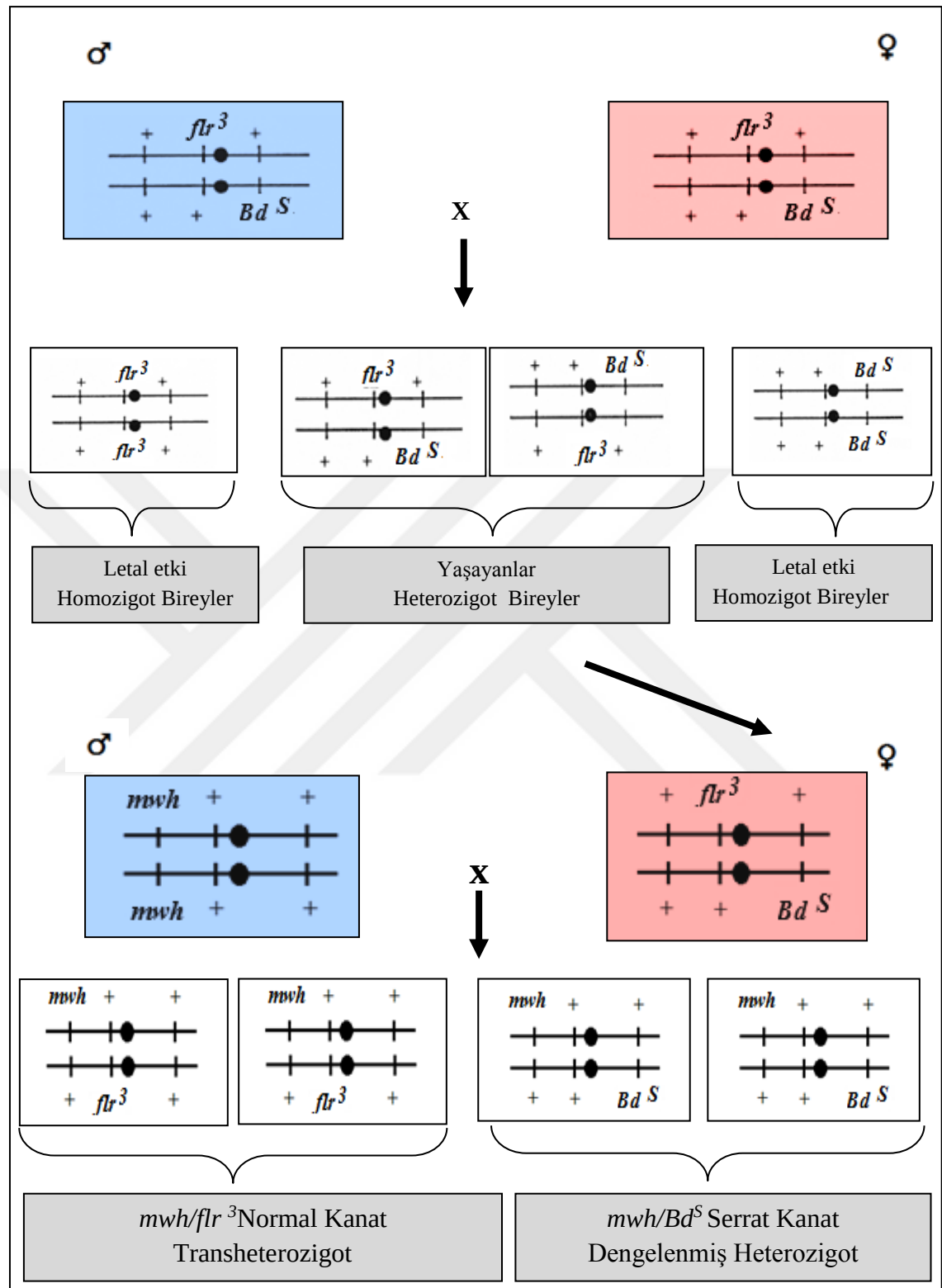
Bu tez çalışmasında normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip hatlar kullanılmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerin genetik yapısı aşağıda sunulan (3.1.) bağıntısındaki gibidir (Lindsley ve Zimm 1992).

- Erkek bireyler : mwh/mwh
- Dişi bireyler : $flr3 / In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^S Bd^S$
- Kısaca dişi bireyler : $flr^3/TM3, Bd^S$ (3.1.)

Graf ve Van Schaik (1992) tarafından genetik çaprazlama ile oluşturulan yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerin genetik yapısı aşağıda sunulan (3.2.) bağıntısındaki gibidir (Lindsley ve Zimm 1992).

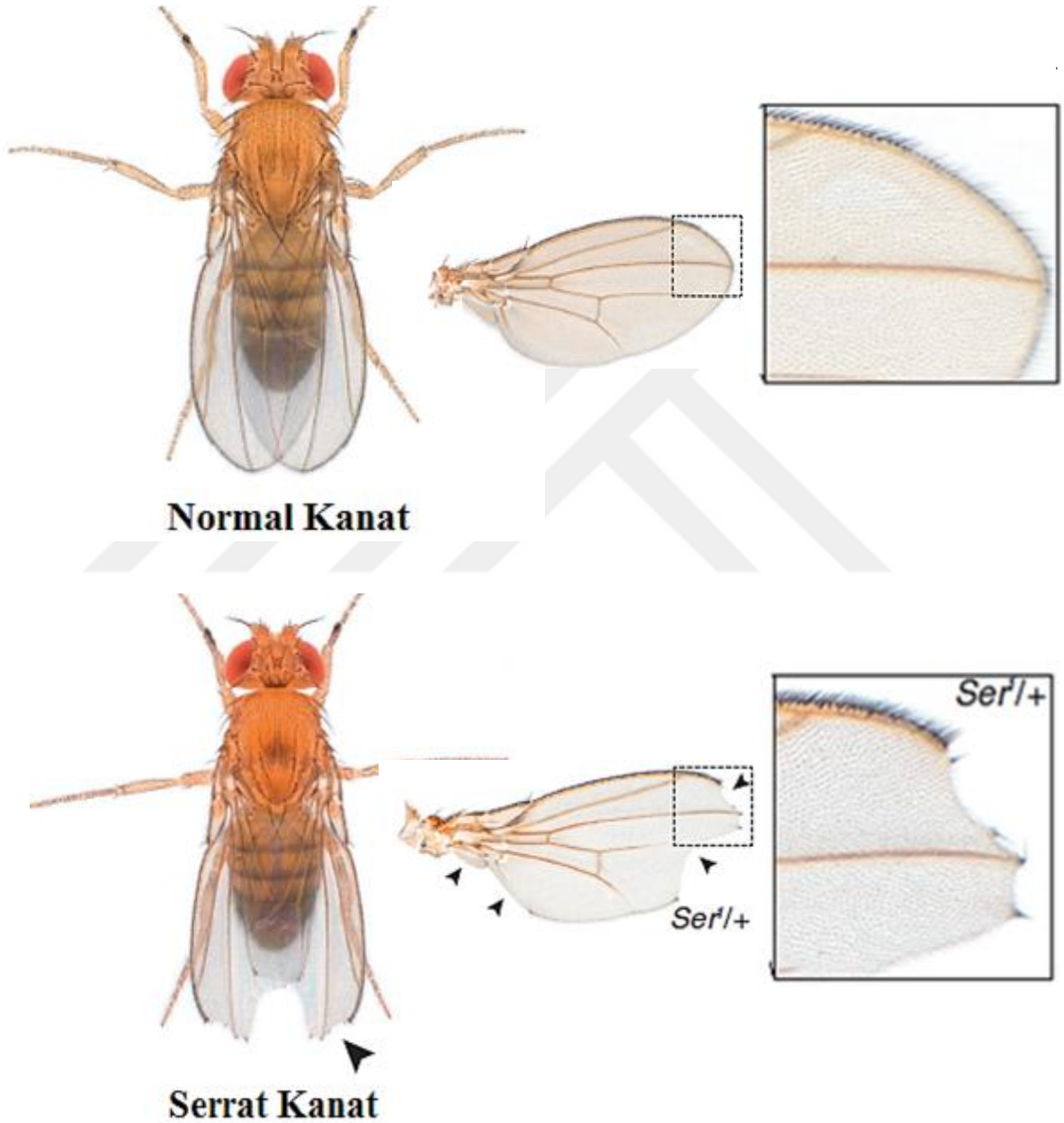
- Erkek bireyler : $NORR/NORR; mwh/mwh$
- Dişi bireyler : $NORR/NORR; flr3 / In (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^S Bd^S$
- Kısaca dişi bireyler : $NORR/NORR; flr^3/TM3, Bd^S$ (3.2.)

Drosophila embriyoları veya larvaları farklı kimyasal bileşik dozlarına maruz kaldıklarında, disk hücrelerinde çeşitli somatik mutasyonlar ve hatta mitotik rekombinasyon etkileri indüklenebilir (Vogel 1986; Frölich ve Würgler 1989). Genotoksik etkiler ile indüklenen mutasyonlar, hayatta kalan *mwh* ve *flr³* genotipine sahip yetişkinlerin fenotip görüntüsü olarak bireylerin kanadı üzerinde bulunan trikomlar ile tespit edilmektedir. *Drosophila* kanat somatik mutasyonlarını ve rekombinasyon etkilerini saptamak için iyi bir genetik sistemdir. *TM3* dengeleyici (balancı) kromozom kullanılarak heterozigotluk sağlanır ve letal etkiden korunulur. *Flare* dişileri *flr3/TM3, Bd^S* ile *mwh/mwh* erkeklerinin çaprazlaması sonucu normal ve serrat kanatlı bireyler meydana gelmektedir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. $flr^3/TM3$, Bd^S bireyleri arasındaki çaprazlama sonucu homozigot ve heterozigot bireylerin elde edilmesi ile mwh/mwh ve $flr^3/TM3$, Bd^S bireyleri arasındaki çaprazlama sonucu dengelenmiş heterozigot mwh/Bd^S ve transheterozigot mwh/flr^3 bireylerin elde edilmesi (Graf vd. 1984'den uyarlanmıştır)

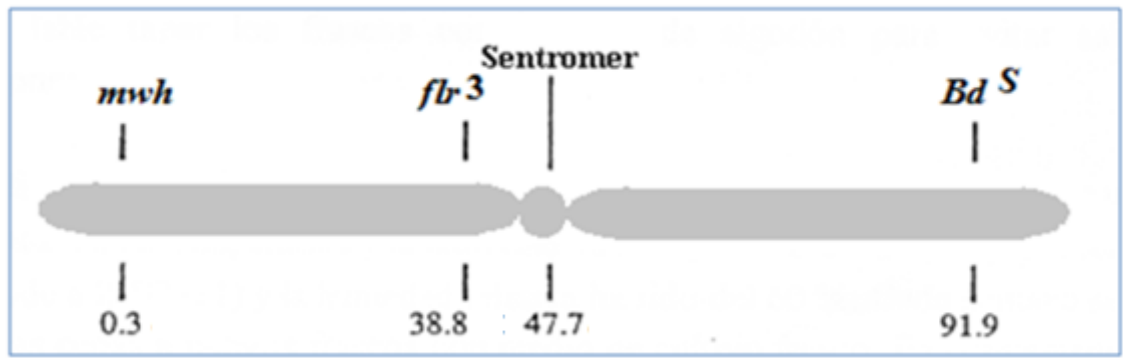
Normal kanatlı bireylerde (Transheterozigot) kanat klonlarının yapısı çeşitli mutasyonlar ve mitotik rekombinasyona bağlı olarak oluşurken, serrat (Balancer heterozigot) kanatlı bireylerde bütün rekombinasyon olayları *TM3* kromozomunun sahip olduğu çoklu inversiyonun elimine edilmesi ile kanat klonları sadece meydana gelen mutasyonlar ile oluşmaktadır. Normal kanat ve serrat kanat yapılarının görüntüsü Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. *Drosophila melanogaster* serrat ve normal kanat görünümü (Chyb ve Gompel 2013'den uyarlanmıştır)

Çalışmalarda dişi birey olarak *flr3/TM3*, *Bd^S* hattı tercih edilmiştir, çünkü *flr³* dişileri *mwh* dişilerine oranla daha fazla yumurta verimine sahip olmaları nedeniyle yapılan çalışma için yeterli sayıda bireylerin elde edilmesini sağlarlar. Bu nedenle çalışmalarda yeterli sayıda birey elde edebilmeyi kolaylaştırmak adına *flr3/TM3* dişileri ile *mwh* erkeklerini eşleştirmek önemlidir (Marcos ve Carmona 2013).

D. melanogaster'in en büyük kromozomu 3. kromozomudur ve 3. kromozomun uzun olması sonucunda kollar üzerinde bulunan belirleyici genler arasındaki mesafede oldukça fazla olmaktadır. Bu durum mutasyonların ve rekombinasyonların oldukça büyük bir aralıkta incelenmesine imkân sağlamaktadır (Şekil 3.11) (Graf vd. 1984, 1992).

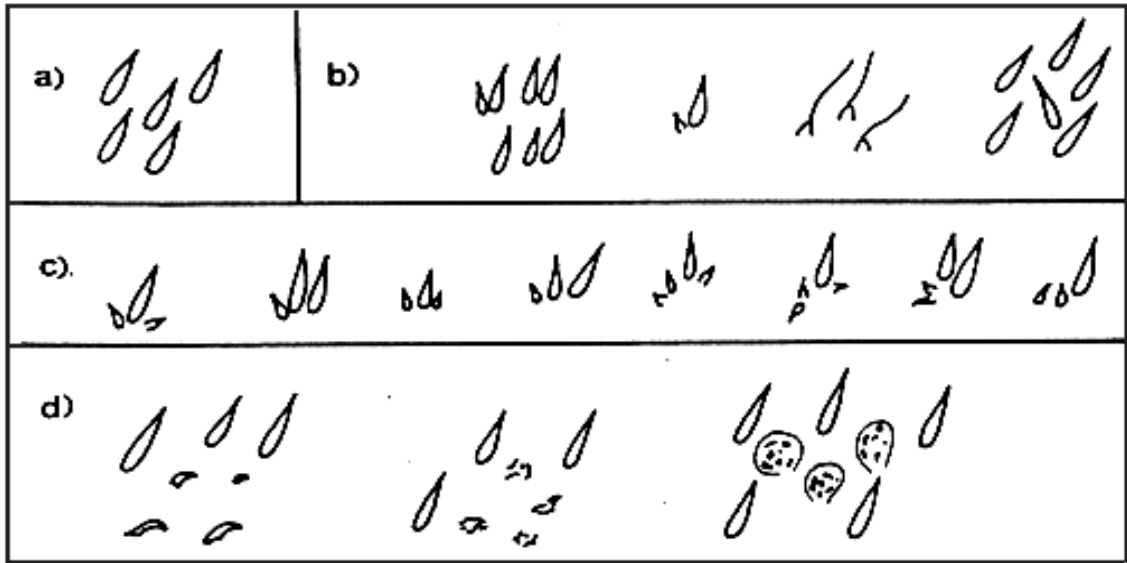


Şekil 3.11. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri (Graf vd. 1984, 1992)

2. kromozomda yer alan *mwh* mutasyonu homozigot halde resesif ve canlıdır. Fenotipik özelliği bir hücrede normal olan trikom özelliği yerine 3 veya daha fazla trikomlu görüntü ile karakterize edilir ve 3. kromozomun aynı kolunda yer alan *flr³* geninde embriyonik evrede iken resesif ve homozigot halde letal etki görülmektedir. Letal etki somatik hücrelerde değildir. *flr³* geni fenotip özelliği kısa kalın ve deforme olmuş amorf yapıda trikomlar halinde oldukça değişkenlik gösteren bir yapıdadır.

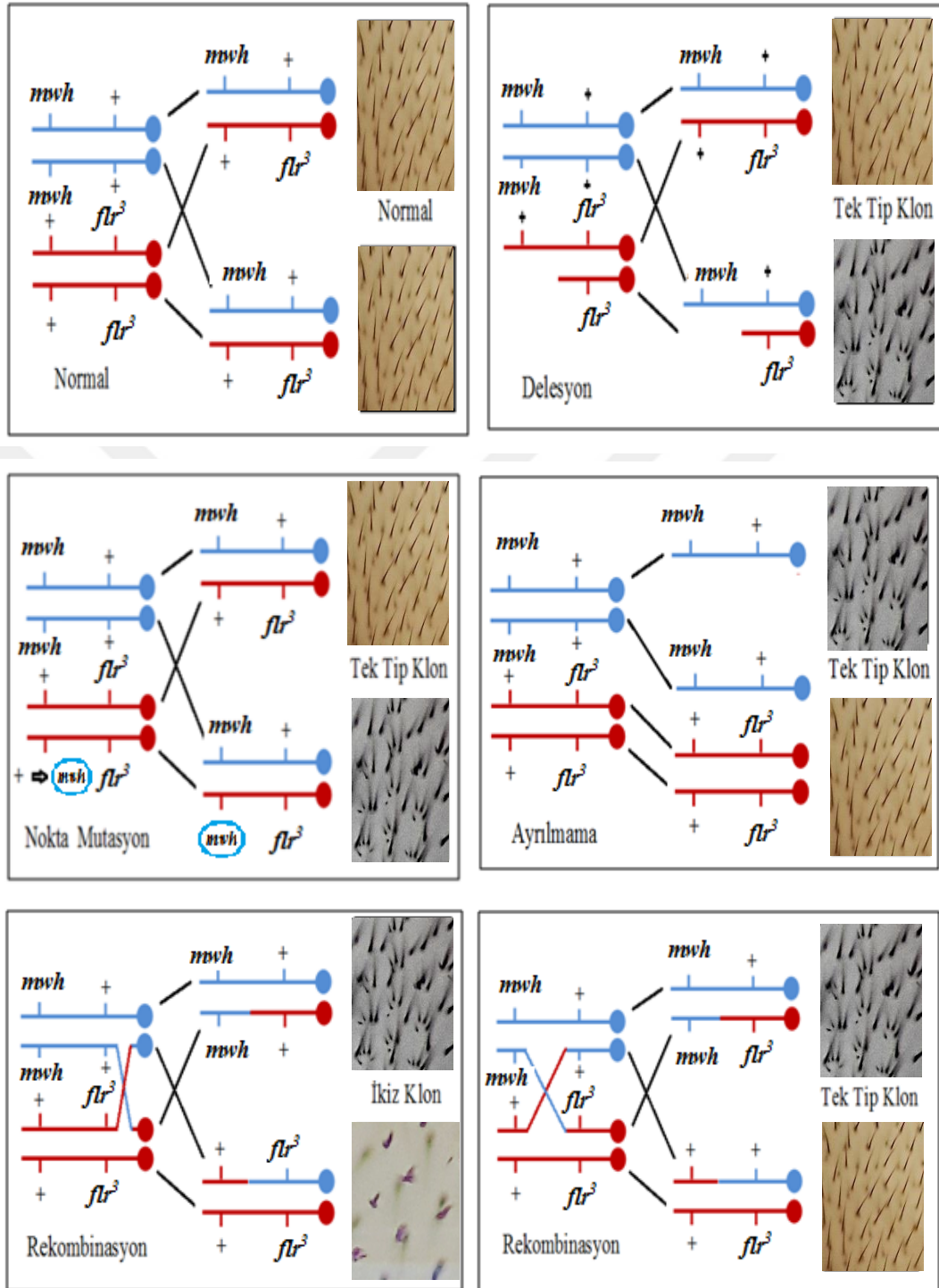
Kanatlarda görülen hücre tipleri (Graf vd. 1984, 1992) (Şekil 3.12):

- *mwh/mwh* : Tek bir trikom yerine her bir hücrede birden fazla kanat kılı
- *flr³/flr³* : Uzun ince kıllar yerine kısa ve hatalı kanat kılları



Şekil 3.12. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne flr^3 ne de mwh olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) mwh trikomlar d) flr^3 genotipe ait trikomlar (Graf vd. 1984, 1992)

Kanat somatik mutasyonları ve rekombinasyonları flr^3 ve mwh klonları ile belirlenir. *Flare* ve ikiz klonlar flr^3 geni ile sentromer bölgesinin arasında gerçekleşmesi sonucunda rekombinasyonlar ortaya çıkarken, mwh klonları ise nokta mutasyon, delesyon, rekombinasyon ve kromozomların ayrılmaması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Farklı genotoksik olayların sonucu oluşan genetik anomaliler ve fenotipe yansıyan tek tip ve ikiz klon görünümür (Graf vd. 1984'den uyarlanmıştır)

3.3. *Drosophila melanogaster* Hatlarının Kültürü

Bu çalışmada kullandığımız *D. melanogaster* hatları, Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde *D. melanogaster* kültürleri için yaptırılmış olan 25 °C sıcaklık ve % 60 bağıl nem ortamına sahip iklim odasında kültüre alındı.

D. melanogaster çalışılan laboratuvar sayısı her geçen gün artmaktadır ve günümüzde yaklaşık olarak 1000 üzerinde laboratuvarın *Drosophila* ile çalıştığı bilinmektedir. *D. melanogaster* laboratuvarlarında farklı çalışmalar yapılırken laboratuvar çalışmaları sırasında kullanılan besin, malzeme ve yapımı farklı şekillerde olsada büyük çoğunluğu *D. melanogaster* besini hazırlarken standart olarak Graf ve diğerleri yaptığı daha önceki çalışmalarda önerdiği mısır unu, toz şeker, maya, agar ve asit karışımını (bakteri fungus vb. kontaminasyonunu önlemek için) kullanmaktadır (Graf vd. 1984, 1992).

Drosophila besininde bakteri ve fungus vb. üremesini engellemek için asit karışımı hazırlanır. Orto- fosforik asitten 83 ml, Piperiyonik asitten 836 ml ve distile sudan 108 ml ölçülerek dikkatli bir şekilde karıştırılır. Koyu renkli şişelerde muhafaza edilerek besin hazırlama işlemlerinde kullanılır.

Drosophila asit karışımı malzemeleri;

● Orto- fosforik asit (Merck)	83 ml
● Piperiyonik asit (Aldrich)	836 ml
● Distile su	108 ml

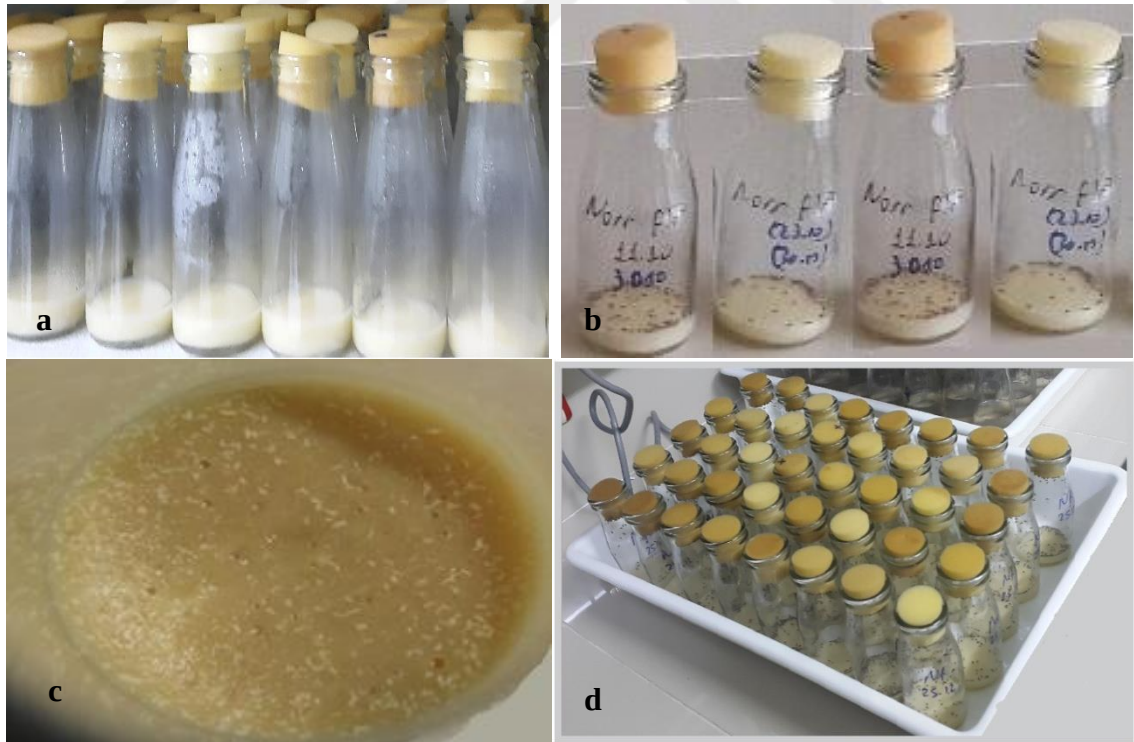
Drosophila melanogaster besin malzemeleri;

● Mısır unu	→	104gr
● Toz şeker	→	94 gr
● Kuru maya	→	19 gr
● Agar	→	5 gr
● Distile su	→	1020 ml
● Asit karışımı	→	6 ml

Drosophila besini hazırlamaya başlarken mısır unu, toz şeker, kuru maya ve agar olmak üzere tüm kuru malzemeler hassas terazi ile istenilen ölçüde tartıldı. Pişirme kabına tartılan malzemeler konuldu ve üzerine distile su eklendi. Homojen bir karışım elde edebilmek için malzemelerde topak kalmayacak şekilde iyice karıştırıldı. Karışımı kısık ateşte sürekli karıştırmak suretiyle kaynaması sağlandı. Kaynamaya başladıktan sonra 1-2 dakika kadar daha kısık ateşte tutularak pişirildi ve ocağın altı kapatılarak besin ateşten alındı. Hazırlanan besinin içerisine daha önceden hazırlanmış olan antifungal özelliği olan asit karışımı eklendi ve asidin besin içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamak için karışım iyice karıştırıldı.

Hazırlanan *Drosophila* besini soğuyup katılaşmaya başlamadan önce halen sıcak bir halde akışkanlığını korurken (200 ml) cam kültür şişelerine yaklaşık 1-1,5 cm kalınlığında döküldü. Şişelerin içindeki buharın çıkması için şişelerin ağzı kurutma kâğıdı ile kapatıldı. Şişelerdeki buhar uzaklaştıktan sonra şişelerdeki besinin yeterince kuruması için şişelerin ağzı süngerlerle kapatıldı. Hazırlanan besinler 1-2 gün bekletilerek tamamen kuruması sağlandı.

Hazır hale gelen taze besinli şişelere döllenmemiş (virgin) dişi bireylerden yeterli sayıda seçilerek toplanabilmesi için kültür zenginleştirildi. Kültürler iklim ayarı $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ve % 60 bağıl nem olarak ayarlanan kültür ortamına yerleştirildi (Şekil 3.14, Şekil 3.15).



Şekil 3.14. *Drosophila* besini a)Hazırlanmış besin; b)Virjin dişilerin bulunduğu besin kavanozları; c) Besinde larvalar; d) Kültürün çoğaltılması



Şekil 3.15. *Drosophila* kültür odası

Kültür ortamına alınan bireyler kuru haldeki besin üzerine yumurtalarını bırakmaları ile başlayan yaşam döngüleri sonucunda ergin bireyler olarak tamamlamaktadır. Pupadan çıkan erkek bireyler kısa bir sürede eşeysel olgunluğa erişirlerken dişi bireyler eşeysel olgunluğa erkeklere göre daha geç 6-12 saat arasında bir sürede erişirler. Dişiler erişkin olgunluğa eriştikten sonra farklı erkeklerle tekrar tekrar çiftleşebilmektedirler. Dişi bireyler ventral haznelerinde spermleri saklayarak yumurtalarını daha sonra dölemek için kullanabilmektedirler (Graf vd. 1992).

Yapılacak olan çalışmalarda istenilen genetik yapıda birey elde edebilmek amacıyla, genetik çaprazlama yapmaya başlamadan önce çaprazlamada kullanılacak dişi bireyin istenilen özellikteki erkek bireyle çiftleşmesini sağlayabilmek için virgin dişi seçiminin yapılması büyük önem taşımaktadır (Graf vd. 1992).

Kültürden virgin seçimi için, ilk önce kültürde bulunan bütün bireyler uzaklaştırılır ve kültürde hiç birey kalmayacak şekilde tüm erkek ve dişi bireylerin uzaklaştırılması sağlanır. Kesinlikle tek bir bireyin dahi kalmadığından emin olunmalıdır. Kültür şişesinin içindeki pupalardan 4 saat sonra çıkan dişi bireyler henüz eşeysel olgunluğa erişemedikleri için virgin dişileri oluşturmaktadırlar. Erkek bireylerde istenilen zamanda toplanabilmektedir. Kültürden çıkan virgin dişi ve erkek birey seçimi yapabilmek için bireylere anestezi uygulanarak bayıltılmaları sağlanmaktadır. Bireylerin bayıltılma işlemlerinde eter veya CO₂ kullanılmaktadır. Eter kullanımı CO₂ kullanımına göre daha kolay ve kullanışlı olduğu için tercih edilmektedir.

Kültürde bulunan tüm ergin bireylerin uzaklaştırılmasını takip eden 4. saat sonunda kültürde pupadan yeni çıkmış olan genç bireyler besin bulunan ortamlarından boş bir şişeye aktarıldı. Bireyler yaklaşık 2-3 dakika eterize edilerek bayılmaları sağlandı. Bayıltılmış bireylere zarar vermeyecek şekilde ucu yumuşak fırça yardımıyla dişi ve erkek bireylerin ayrımının yapılması ile virgin dişiler seçildi. Seçilen virgin dişiler yeni olan taze besinli şişelere konuldu. Yeterli sayıda virgin dişi elde edilince

dişi birey bulunan şişelere istenilen genetik özellikteki erkek bireyler konularak çaprazlamalar yapıldı.

3.4. Trans Heterzigot Larvaların Elde Edilmesi

Bu çalışmanın uygulamalarında kullanılacak olan normal metabolik aktiviteye sahip bireylerden transheterozigot larvaların elde edilmesi için *mwh/mwh* ve *flr³/TM3*, *Bd^S* genetik yapıya sahip bireyler çaprazlandı. Yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireylerden transheterozigot larvaların elde edilmesi için NORR/NORR; *mwh/mwh* ve NORR/NORR; *flr³/TM3*, *Bd^S* genetik yapıya sahip bireyler çaprazlandı.

Çaprazlamada kullanılan dişi bireylerin seçimi yapılırken, en yüksek yumurta verimine sahip olduğu için *flr³/TM3*, *Bd^S* hattının dişi bireyleri tercih edilmiştir.

Virgin *flr³* dişilerini elde edebilmek için kültürde bulunan *flr³* şişelerinden tüm bireyler uzaklaştırıldı. Aynı işlem kültürde bulunan *mwh* şişelerinde bulunan tüm bireylerin uzaklaştırılması içinde uygulandı. Uzaklaştırmadan sonra 4'er saat aralıklarla yeni çıkan *flr³* dişi bireyleri ve yeni çıkan genç *mwh* erkek bireyleri taze olan yeni besin bulunan şişelere toplandı. Üreme verimliliğinde bireylerin yaşı etkili olduğu için, en uygun yaş olarak 3-7 günlük bireyler tercih edildi.

Seçilen virgin *flr³* dişi bireyleri ve genç *mwh* erkek bireyleri taze besinde bir araya toplandı. Uygulama tüplerinin her birine yetecek sayıda larva elde edilebilmesi için 40 *flr³* dişi birey ve 40 *mwh* erkek birey olacak şekilde çaprazlama işlemi için şişelere konularak bireylerin çiftleşmeleri sağlandı. Çaprazlama şişesinde bireyler, aynı ortamda en az 1 gün bırakılarak döllenme ve embriogenezin gerçekleşmesi sağlandı. Bu bireyler daha sonra yeni besin bulunan şişelere aktarıldı ve 8 saat boyunca besine yumurtalarını bırakmaları sağlandı. 8'inci saatin sonunda bireyler eski şişelerine tekrar geri aktarıldı. 8 saatlik yumurta toplama işlemi ile aynı larval evrede olan transheterozigot larvalar elde edildi. Tüm uygulamalara yetecek kadar larva için bu bireyler defalarca kullanılmak suretiyle yumurta toplama işlemine devam edildi ve yeterli sayıya ulaşıncaya işlem tamamlandı. Transheterozigot larvaların elde edilmesinde kullanılan çaprazlama sayfa 55'de Şekil 3.9'da ayrıntılı gösterilmektedir.

3.5. Deney Grupları

Yapılan çalışmada insektisit olan düşürücü etkili kimyasal Tetramethrin ile S-bioallethrin ve sinerjist etkili PBO kullanıldı. Bu çalışmada Tetramethrin, S bioallethrin ve PBO'nun tüm konsantrasyonları %3'lük Aseton ile çözülerek derişimleri hazırlandı. Kimyasalların çözünme işlemlerinde %3'lük Aseton kullanılması sebebiyle distile su ve aseton negatif kontrol grubu olarak, yapılan başka çalışmalar ve daha önce laboratuvarımızda yapmış olduğumuz çalışmalar sonucu mutajenik etkisi kanıtlanmış olan Etil Metan Sülfanat (EMS)'nin 1 mM'lık derişimi pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kullanılan kimyasal maddelerin kimyasal yapıları, CAS numaraları, saflık dereceleri ayrıntılı biçimde Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.* Çalışmada kullanılan kimyasalların lineer gösterimi

Kimyasal adı CAS numarası Molekül Ağırlığı Saflık dereceleri	LİNEER ve MOLEKÜL FORMÜL
S-Bioallethrin CAS # 28434-00-6 302.414 g / mol % 97	$CC_1=C(C=O)CC_1OC(=O)C_2C(C_2-(C),C)C=C(C),C,CCC$ $C_{19}H_{26}O_3$
Tetramethrin CAS # 7696-12-0 331.412 g/mol % 95	$CC(=CC_1C(C_1(C)C)C(=O)OCN_2C(=O)C_3=C(C_2=O)CCCC_3)C$ $C_{19}H_{25}NO_4$
Piperonil Bütoksit (PBO) CAS # 51-03-6 338.438 g / mol % 99	$CCCCOCCOCCOCC_1=CC_2=C(C=C_1CCC)OCO_2$ $C_{19}H_{30}O_5$
Aseton CAS # 67-64-1 58.08 g / mol % 99	$CC(=O)C$ C_3H_6O
Etil Metan Sülfanat (EMS) CAS # 62-50-0 124.16 g / mol % 99	$CCOS(=O)(=O)C$ $C_3H_8SO_3$

*Çalışmada kullanılan kimyasallar ticari olarak Sigma ve Adrich'ten temin edilmiştir.

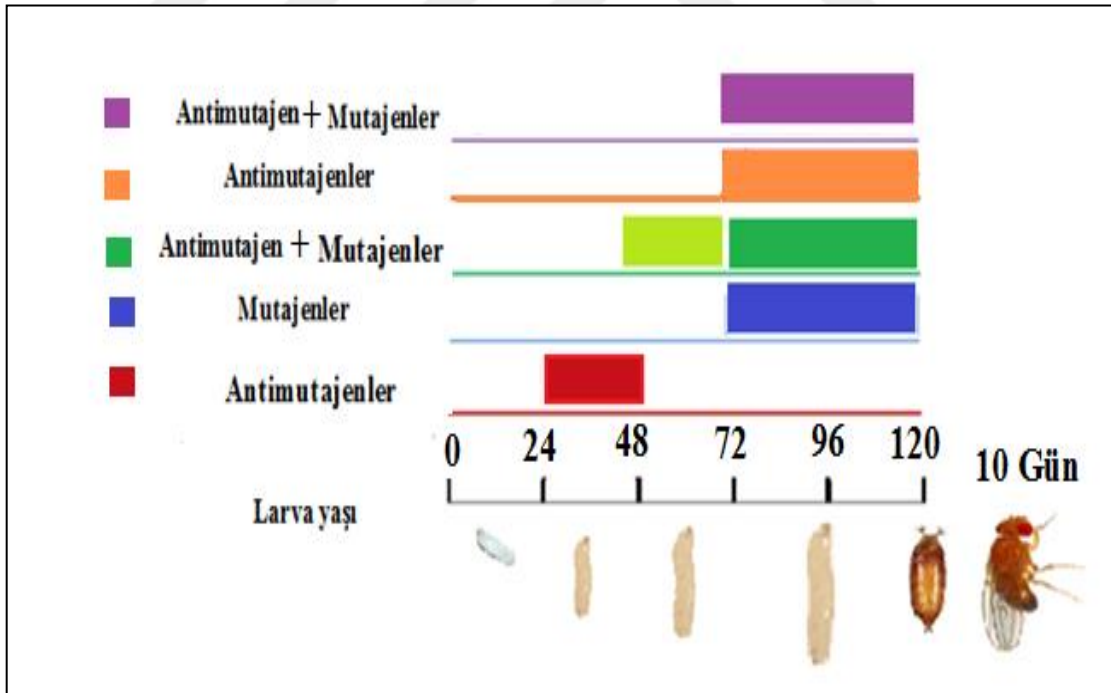
3.6. Kimyasal uygulamaları

Drosophila SMART için uygulamalar farklı şekillerde yapılabilmektedir. Uygulamanın yapılacağı zaman ve uygulama süresi bakımından farklı uygulama yöntemleri mevcuttur. Farklı uygulama yöntemleri Şekil 3.16'da verilmiştir (Graf vd. 1984, 1995; Guzman-Rincon vd. 2001).

Graf (1995) yapmış olduğu çalışmada *D. melanogaster*'in bir kimyasal mutajene maruz kalma süresi, uygulama sıklığı ve uygulama zamanı arasında bulunan ilişkiyi araştırmış ve sonucunda mutajenin uygulanma süresi ile *D. melanogaster*'de kanat hücrelerinde bulunan mutant klonların indüksiyonu arasında bir korelasyon bulunduğunu göstermiştir. SMART'te kullanılacak bireylerde en uygun yaşın 72 saatlik bireyler olduğunu iki nedenle açıklamıştır.

İlk olarak indüklenen mitotik rekombinasyonun göstergesi olan ikiz klonların indüksiyonunu gözlemleme şansı bu evrede en yüksektir ve ikincisi, bu evrede *mwh* klon indüksiyon sıklığı da yüksektir. Bu nedenle tez çalışmamızda en uygun yaş olan 72 saatlik larvalara kullanılan kimyasallar uygulanmıştır.

Graf (1995) yapmış olduğu çalışmada ayrıca *Drosophila* SMART testinde kimyasal bileşiklerin rutin genotoksisite testi için tercih edilenin larvalarda akut olarak değil, kronik olarak açığa çıkarmak olduğunu önemini vurgulamaktadır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. *Drosophila* SMART için farklı kimyasal uygulama zamanlamaları (Guzman-Rincon vd. 2001'den uyarlanmıştır)

Zordan ve diğerleri (1991) normal olarak, larvaların imajinal disklerindeki hedef hücrelere ulaşan bileşiğin dozunu belirlemek mümkün değildir. Bununla birlikte, bireysel larvalar tarafından alınan kimyasal bileşiğin miktarlarının kantitatif ölçümü için yöntemlerin mevcut olduğunu belirtmişlerdir.

Kimyasalların genotoksik olarak etkilerinin saptanması ön çalışmalarla belirlendi ve toksik etki göstermeyen farklı derişimleri kullanıldı. Tek başına uygulamalarda 5 doz, birlikte uygulamalarda 3 doz uygulama yapıldı.

Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO nun çözücüsü olarak %3'lük Aseton kullanıldı. Hazırlanan kimyasallar manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir karışım elde edildi. Kimyasallar hazır hale geldikten sonra, uygulama tüplerine yaklaşık 4.5 gr *Drosophila* hazır besini (*Drosophila* Instand Medium) konuldu ve üzerlerine hazırlanan kimyasalların derişimlerinden 9 ml eklenerek besin ıslatıldı. Uygulama için elde edilen transheterozigot larvalar 72 ± 4 saatlik oldukları zaman şişeleri musluk suyu altında bireylerin zarar görmeyecek şekilde elek yardımı ile ayrılarak uygulama aşamasına geçildi. Yıkama işlemi ile yüzeye çıkan bireyler ince ve sık gözenekli elekten süzülerek elde edilen larvalardan 2-3 spatül alındı ve kimyasal derişimleri ile ıslatılmış olan uygulama tüplerine eklenmek suretiyle kimyasala maruz bırakıldı. Bu araştırmada izlenecek deneysel yöntem Kaya vd. (2000a)'nın çalışmalarındaki gibi yapıldı.

A-) Bu çalışmada, kullanılan normal metabolik aktiviteye sahip bireyler için;

Analizlerde aşağıdaki şekilde bir yol izlendi:

- 1- Birinci grupta, 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip larvalar sadece S-bioallethrin'in 5 farklı dozuna (0.1, 0.5, 1, 5 ve 50 ppm) maruz bırakıldı.
- 2- İkinci grupta, 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip larvalar sadece Tetramethrin'in 5 farklı dozuna (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) maruz bırakıldı.
- 3- Üçüncü grupta, 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip larvalar sadece PBO'nun 5 farklı dozuna (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) maruz bırakıldı.
- 4- Dördüncü grupta, 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip larvalar Tetramethrin ve PBO birlikte uygulamaların 3 farklı dozuna (25 ppm PBO + 3.125, 6.25, 12.50 ppmTetramethrin) maruz bırakıldı.
- 5- Beşinci grupta, 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip larvalar S-bioallethrin ve PBO birlikte uygulamaların 3 farklı dozuna (25 ppm PBO + 0.5, 1 ve 5 ppm S-bioallethrin) maruz bırakıldı.
- 6- Pozitif kontrol olarak 1 mM EMS ve negatif kontrol olarak derişimlerinin hazırlanmasında kullanılacak olan distile su ve %3'lük aseton 72 ± 4 lik normal metabolik aktiviteye sahip larvalara uygulandı.

B-) Bu çalışmada, kullanılan yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireyler için; Analizlerde aşağıdaki şekilde bir yol izlendi:

- 7- Birinci grupta, 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalar sadece S-bioallethrin'in 5 farklı dozuna (0.1, 0.5, 1, 5 ve 50 ppm) maruz bırakıldı.
- 8- İkinci grupta, 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalar sadece Tetramethrin'in 5 farklı dozuna (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) maruz bırakıldı.
- 9- Üçüncü grupta, 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalar sadece PBO'nun 5 farklı dozuna (1, 5, 25, 50 ve 100 ppm) maruz bırakıldı.
- 10- Dördüncü grupta, 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalar Tetramethrin ve PBO birlikte uygulamaların 3 farklı dozuna (25 ppm PBO + 3.125, 6.25, 12.50 Tetramethrin ppm) maruz bırakıldı.
- 11- Beşinci grupta, 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalar S-bioallethrin ve PBO birlikte uygulamaların 3 farklı dozuna (25 ppm PBO + 0.5, 1 ve 5 ppm S-bioallethrin) maruz bırakıldı.
- 12- Pozitif kontrol olarak 1 mM EMS ve negatif kontrol olarak derişimlerinin hazırlanmasında kullanılacak olan distile su ve %3'lük aseton 72 ± 4 lik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip larvalara uygulandı.

Tüm uygulamaların yapımı tamamlandıktan sonra uygulama tüplerinin ağızları süngerlerle kapatılarak 25 ± 1 °C de % 60 bağıl nem ayarlı iklim odasında bireyler ergin birey haline gelinceye kadar tutuldu (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Kimyasal uygulaması yapılmış uygulama tüpleri

3.7. Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Kanat preparatlarının yapımına geçmeden önce +4 °C de buzdolabında % 70 etilalkol içerisinde muhafaza edilen bireyler de serrat ve normal kanat fenotipinde bireyler birlikte bulunmaktadır. Stereo mikroskop altında distile su bulunan küçük bir petri kabına tamamen tesadüfî olarak rastgele yapılacak birey sayısı kadar normal kanat fenotipli bireyler seçildi. Preparat hazırlarken yapıştırma işleminde kullanacağımız faure solüsyonu hazırlandı.

Faure solüsyonu:

- | | |
|------------------------|-------|
| ➤ Kloral hidrat(merck) | 50 gr |
| ➤ Gum arabic (Aldrich) | 30 gr |
| ➤ Gliserol | 20 ml |
| ➤ Distile su | 50 ml |

Seçilen normal kanatlı bireyler çukur lamın ortasına damlatılan faure solüsyonu içerisine birer birer alındı. Diseksiyon iğnesi ve ince uçlu pens kullanılarak faure solüsyonu içerisindeki bireylerin kanatları üzerinde bulunan trikomlara zarar vermeden kanatların vücuda birleşen yerin en uç kısmından dikkatli bir şekilde tutularak kanat vücuttan kopartılarak ayrıldı.

Faure içinde vücuttan ayrılmış olan sineğin kanatları, kanadın vücuda tutunduğu en uç kısmı olan bölgeden kanada zarar vermeden ince uçlu pens yardımı ile tutularak lam üzerine belirli aralıklarla yan yana gelecek biçimde çift olarak yapıştırıldı. Sırayla düzgün bir şekilde bütün kanatlar tamamlanana kadar bu işleme devam edildi (Şekil 3. 18).



Şekil 3.18. Kanat uygulama preparatları (Orijinal)

Bu çalışmada istatistiksel verilerin değerlendirmeleri 80 kanat üzerinden yapıldı. Bu nedenle her bir uygulama dozu için 2'şer preparat hazırlandı. Her iki preparata 24

bireyin kanatları (48 kanat) yapıştırıldığı için toplam 48 bireyin kanatları (96 kanat) yapıştırıldı.

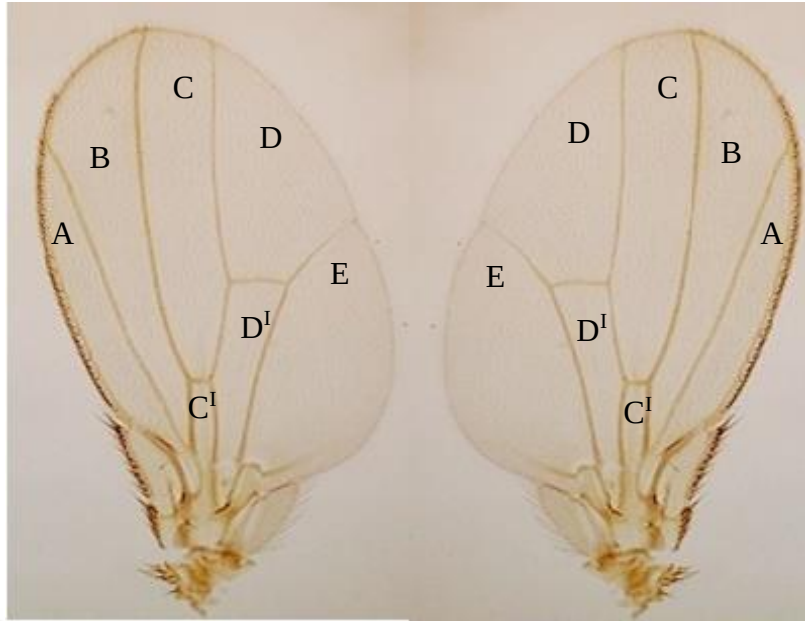
Kanat yapıştırma işlemi tamamlanarak hazır hale gelen preparatların tozsuz bir ortamda kurummasını sağlamak için petri kutusu içerisinde bir (1) gün boyunca kurumaya bırakıldı. Bir gün sonra kanat preparatlarını daimi olarak kalıcı preparat haline getirme işlemi yapıldı. Bu işlem kuruyan preparatların tam orta kısmına gelecek şekilde 1-2 damla faure solüsyonu damlatılarak üzeri 24x60 mm ince lamel kullanarak, 45 °C'lik açılı ile lam lamel arasında hava kabarcığı kalmayacak bir şekilde kapatıldı.

Kapatılan preparatlar düz bir zemine yerleştirildi, üzerine yaklaşık 40 gr'lık metal bloklar konuldu. Metal bloklar kanatların düzleşmesini sağlayarak kurumayı için iki gün boyunca bekletildi. İkinci günün sonunda metal ağırlıklar alınarak sayıma hazır hale getirilen preparatlar preparat kutusuna konularak sayım aşamasına kadar muhafaza edildi.

3.8. Kanat Preparatlarının Mikroskop İle Analizi

Hazırlanan kanat preparatları **Nikon YS100** model ışık mikroskobu kullanılarak 40x10 büyütme gücünde incelendi. Mikroskoptaki inceleme sırasında kanatların her iki yüzünde bulunan trikomları net bir şekilde görebilmek için devamlı mikro vida ile ince ayar yapıldı. İnce ayar sayesinde sektörlerde bulunan mutant olan *mwh* ve *flr³* fenotipine sahip klonların olup olmadığı araştırıldı. Araştırma sırasında bulunan mutant klonların kayıtlarının tutulması için çizelge hazırlandı. Hazırlanan özel çizelgeye tespit edilen mutant klonların kayıtları tutuldu.

Kanatların üzerinde bulunan sektörler sayım aşamasında hem belirlenen mutant klonların hangi sektörde bulunduğu tespit edilmesinde hem de tespit edilen klonların kayıtlarının tutulmasında kolaylık sağlamasından dolayı bu sektörler A, B, C, C', D, D' ve E olmak üzere bölümlere ayrılarak kayıtlar tutuldu (Graf vd. 1984). Bu bölümler sadece sayım işlemini kolaylaştırmak ve kayıt sırasında oluşabilecek herhangi bir karışıklığı önlemek adına yapılmaktadır (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Kanat sektörlerinin şematik görünümü

Birinci larval evrede (24 saatlik larva) kanatların oluşumunu sağlayan imajinal disk hücreleri larvanın yumurtadan çıktığı anda yaklaşık olarak 50-100 kadardır. Larvalarda gelişimi sırasında sürekli hücre bölünmelerinin devam etmesi sonucunda üçüncü larval evrede (72 saat larva) kanatları oluşturacak imajinal disk hücreleri yaklaşık 24.400 tane bulunmaktadır. Larvaların gelişimlerinin devam etmesiyle birlikte hedef hücreler daha da çoğalarak sayıları artmaktadır.

Kanat farklılaşması başladığında erken pupada yaklaşık 30.000 hücre boyutuna ulaşırlar. Bu nedenle, mutajene maruz kalan larvaların büyümesi ile birlikte klon indüksiyon frekanslarının artması beklenmektedir. Klon indüksiyon frekansının tersine, indüklenen klonların büyüklüğünün, larvaların büyümesi ile azalması beklenir. Dolayısıyla larvaların büyüklüğünün bir fonksiyonu olarak klon büyüklüğü ve klon frekansı arasındaki ters bir durum söz konusudur. İmajinal disk hücrelerinde bulunan bu hedef hücrelerden her hangi birinde oluşacak olan mutasyon, bu hücrelerin bölünmesiyle mutant klon olarak gözlenmektedir (Graf vd. 1995; Kaya 2000).

Kanat nokta testi ayrıca çeşitli kimyasal bileşik gruplarının yapı aktivite ilişkilerini incelemek için yararlıdır. Kanatlardaki noktaların sıklığını ve boyutunu etkileyebilen çeşitli parametrelerin çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, *Drosophila*'nın ksenobiyotiklerin metabolizması için çok yönlü bir sisteme sahip olduğu iyi bilinmektedir (Graf 1992, 1995).

İmajinal diskler, larva gelişiminin tüm periyodu boyunca mitotik bölünme ile sürekli olarak büyüyen dokulardır. Mitotik bölünme sırasında imajinal disk hücrelerinden birinde meydana gelen genetik bir değişiklik, tüm bölünen hücrelerde

mevcut olacaktır ve bunlar, mutant hücrelerin bir klonunu oluşturacaktır. Bu duruma klonal genişleme denilmektedir.

Sayımda gözlenen mutant klonların kayıtları, Graf vd. (1984) tarafından biyolojik olarak anlamlı gösterilen beş kategoride değerlendirildi.

Mutant klonların sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Graf vd. 1984).

- Küçük tek tip klon
- Büyük tek tip klon
- İkiz klon
- Toplam klon
- Toplam *mwh*

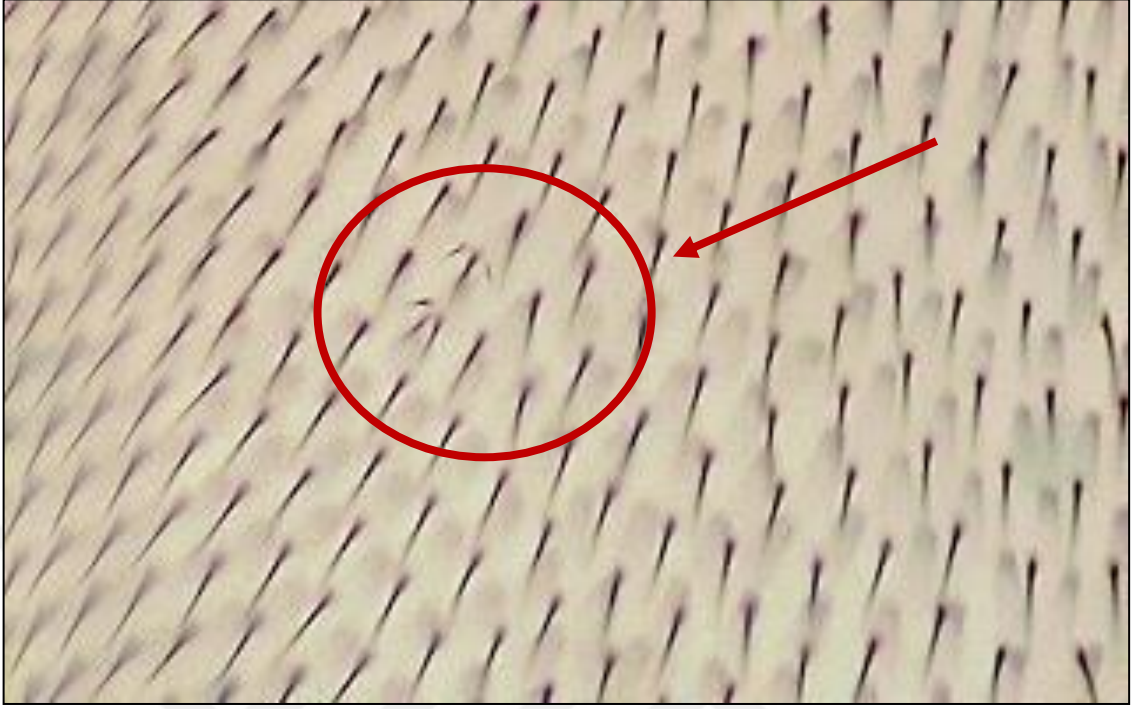
Küçük tek tip klonlar sadece 1 veya 2 tane *mwh* klonundan oluşmaktadır (Şekil 3.20). Bunun nedeni daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi tek başına 4'ten az *flr*³ klonlarının varyasyon sonucunda oluştuğunun belirtilmesi bu sebeple mutant olarak oluşan *flare* klonundan ayırt edebilmek adına değerlendirmelerde sayıma dahil edilmemesidir.

Büyük tek tip klonlar 3 veya 3'ten daha fazla *mwh* klonları (Şekil 3.21) ile 4 ve 4'ten daha fazla *flr*³ klonlarından (Şekil 3.22) oluşmaktadır. Szabad vd. (1983) yaptığı çalışmalarda belirtildiği gibi tek başına *flr*³ klonlarının 4'ten az olmasının varyasyon nedeniyle gerçekleşebildiği bu sebeple çalışmadaki bulgular dikkate alındığında değerlendirmelerde sayıma dahil edilemeyeceği sadece 4 ve 4'ten fazla olan *flr*³ klonlarının değerlendirmelerde sayıma dahil edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Graf vd. 1984; Kaya 2000; Marcos ve Carmona 2013).

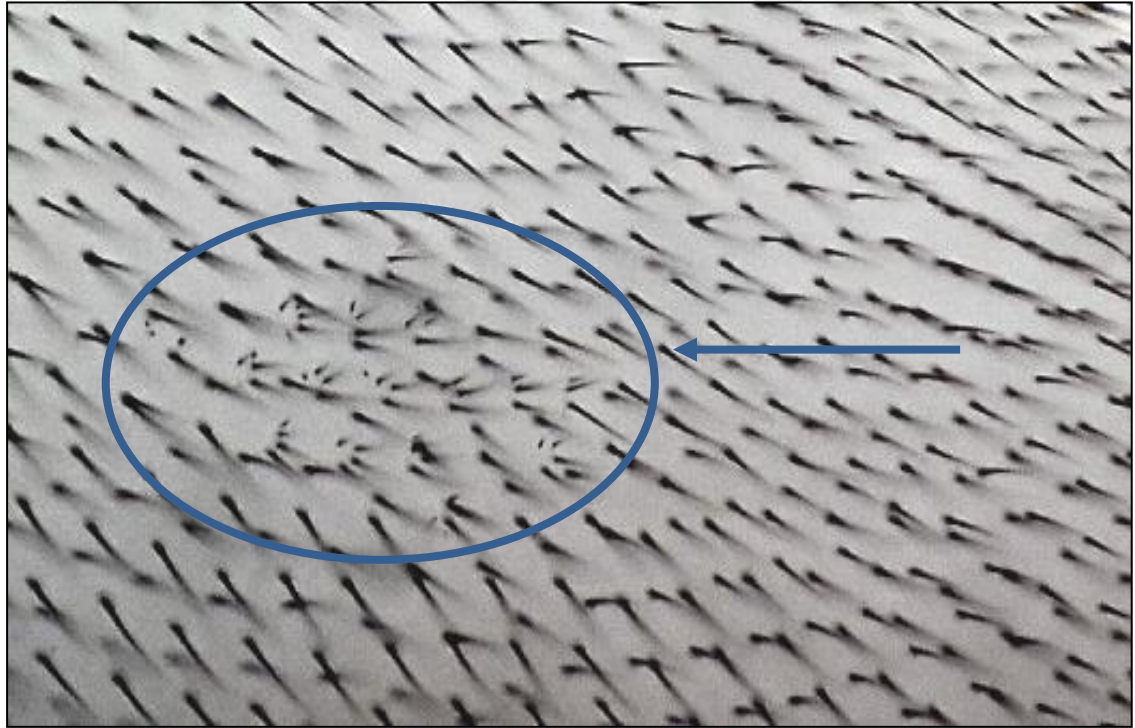
İkiz klonlar ise hem *mwh* hem de *flr*³ klonlarının aynı klon içerisinde bir arada bulunduğu klonlardan oluşmaktadır (Şekil 3.23). İkiz klonların değerlendirmelerini yaparken iki klon arasında üç ya da daha fazla sayıda yaban tip trikom sırası bulunuyorsa iki farklı klon olarak değerlendirildi (Graf vd. 1984; Kaya 2000; Marcos ve Carmona 2013).

Toplam *mwh* klonlar ise kanat çiftinde bulunan küçük tek tip ve büyük tek tip *mwh* klonları ile ikiz klonların toplamından oluşmaktadır. İstatistiksel değerlendirme toplam *mwh* klon sayısına göre yapılmaktadır.

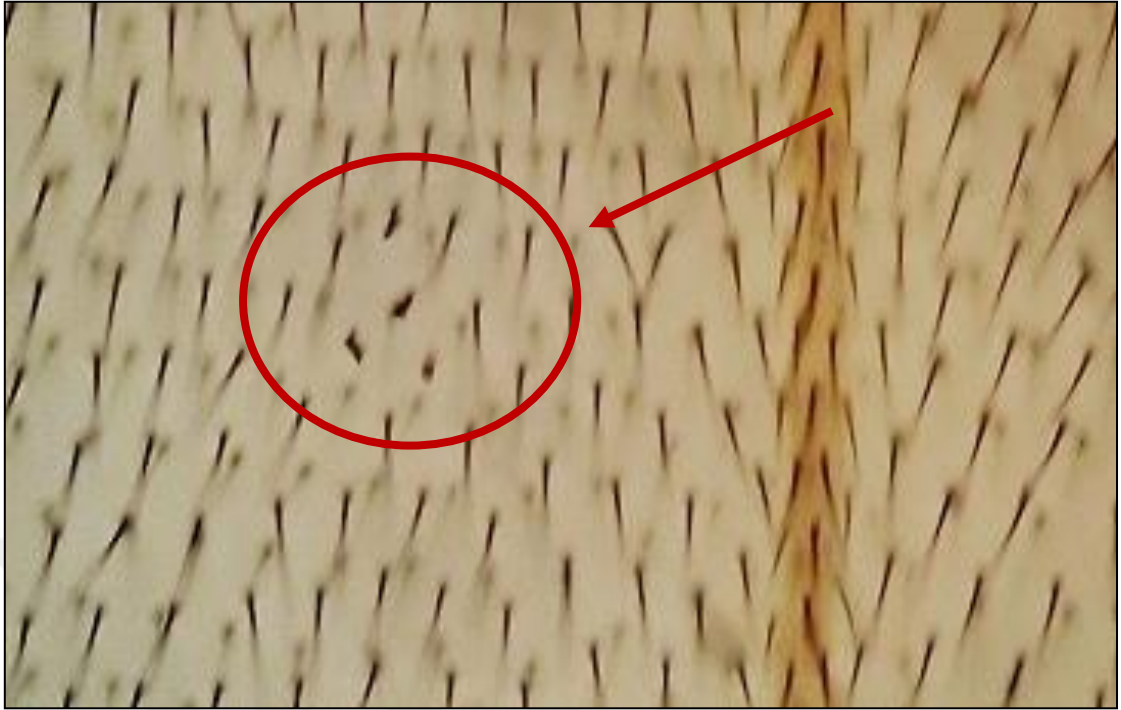
Toplam klonlar ise kanat çiftinde bulunan küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonlardaki tüm mutant (*mwh* ve *flr*³) klonların sayısının toplamıdır.



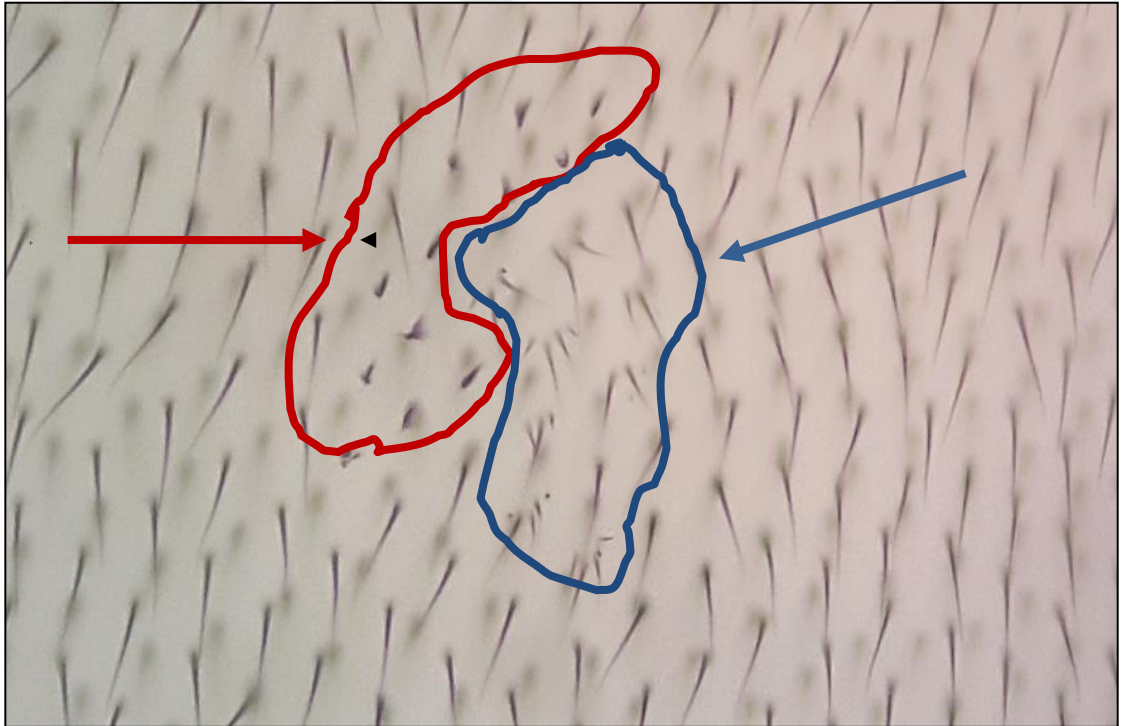
Şekil 3.20. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü



Şekil 3.21. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü



Şekil 3.22. Büyük tek tip flr^3 mutant klonların görünümü



Şekil 3.23. İkiz mutant klonların görünümü

3.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Mutajenin etkinliği, mutajene maruz kalan hücrelerin ve klon indüksiyonunun gerçekleştiği hücrelerin kısımları klon indüksiyon ortalama frekansı ile karakterize edilerek belirlenebilmektedir.

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Szabad vd. 1983). Formül (3.3) bağıntısında verilmiştir.

$$f = \frac{n}{NXC} \times 10^5 \quad (3.3)$$

Ortalama indüksiyon frekansında yalnız *mwh* klonları göz önünde bulundurulursa formülde;

f = *mwh* klonlarının indüksiyonunun ortalama frekansını,

n = gözlenen toplam *mwh* klon sayısını,

N = Analiz edilen kanat sayısını

C = bir kanat üzerindeki incelenilecek hücre sayısını

belirtmek üzere ifade edilirler.

3.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sonuçlarının değerlendirilebilmeleri amacıyla bir bilgisayar paket programı olan MİCROSTA geliştirilmiştir. Kanat preparatlarının sayımları sonucunda elde edilen veriler bilgisayar programı Microsta ile değerlendirildi.

Verileri değerlendirmeye başlamadan önce değişkenler arasındaki ilişkilerin farklılıklarını belirlemeye yönelik Orijinal (H_0) ve alternatif (H_A) olmak üzere iki ayrı hipotez kuruldu. H_0 orijinal, null, yokluk, sıfır hipotezi, H_A ise alternatif veya araştırma hipotezi olarak adlandırılmaktadır.

Orijinal H_0 hipotezi kurulurken uygulama grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı varsayıldı. Alternatif H_A hipotezi kurulurken uygulama grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel farkın uygulama grubundaki indüklenme sonucu oluşan mutasyon oranının kontrol grubundan m (çarpım sabiti) defa fazla olduğu varsayıldı.

Hesaplamalar sonucunda, eğer uygulama grubundaki (nt) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 red edildi. Aynı yöntemle, kontrol grubundaki (nc) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_A red edildi. Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden, orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken yararlanıldı.

Binominal şartlı test kullanılmasıyla kurulan orijinal H_0 ve alternatif H_A hipotezlerinin hesaplamaları yapıldı. Hesaplama sonuçları, pozitif (+), zayıf Pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif(-) olarak gösterildi. Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 3.2' de gösterilmiştir (Selby ve Olson 1981; Frei ve Würbler 1988).

Çizelge 3.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.

HİPOTEZLER		H_A	
		KABUL (1- β)	RED (β)
H_0	KABUL (1- α)	Önemsiz Fark $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	Negatif $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED (α)	Pozitif $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	Zayıf Pozitif $P=\alpha\beta$

4. BULGULAR

4.1. *Drosophila melanogaster* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) Kullanılarak İnsektisitlerin Genotoksikolojik Etkilerinin Belirlenmesi

Drosophila SMART ile normal ve yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireylerin 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarına, insektisit grubu Tip I piretroidlere ait düşürücü etkiye sahip Tetramethrin ve S-bioallethrin ile kimyasallarda sinerjistik etki sağlayan Piperonil bütoksit (PBO)'nun farklı derişimlerinin tek başına ve birlikte uygulamaları yapılarak genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de tablo halinde ve Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de grafik halinde verilmiştir.

Renksiz, kokulu, sıvı formda iyi bir çözücü olan aseton tarım alanında fungusit, insektisit ve herbisitlerle ilgili tarımsal ilaçlar üretilirken, etken maddeler için çözücü ve taşıyıcı ajan olarak kullanılır. Aslında, aseton çeşitli mutajenite analizlerinde suda çözünmeyen maddelerin test edilmesi için bir araç olarak kullanılmaktadır.

Aseton, yoğun olarak çalışılmıştır ve genellikle yutulduğunda veya solunduğunda oldukça düşük akut ve kronik toksisiteye sahip olduğu kabul edilmektedir. Aseton şu anda bir kanserojen, mutajenik bir kimyasal veya kronik nörotoksisite etkileri için bir endişe verici olarak görülmemektedir. Çalışmalarda aseton *in vitro* ve *in vivo* analizler ile test edilmiştir. Bu çalışmalar asetonun genotoksik olmadığını göstermektedir (Yavuz ve Aksoy 2016).

EMS, karsinojenik ve teratojenik özelliklere sahip bir sülfonoksialkildir. EMS, DNA'ya zarar verir, böylece DNA'ya zarar vermesi ile genetik mutasyonlara, DNA'daki tek iplikli kırılmalara ve kromozomal anormalliklere yol açar. EMS biyomedikal araştırmalarda deneysel olarak kullanılabilir (Sega 1984).

Bu tez çalışmasında, yapılan ön çalışmamızda %3'lük Aseton kullanıldığında kimyasalların distile suya oranla daha fazla çözündüğü ve distile suya göre homojen dağılımın daha iyi olması nedeniyle çalışmamızda kullanılan tüm kimyasalların çözücü kontrolü olarak %3'lük Aseton kullanılmıştır.

İnsektisitlerin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi sırasında her bir derişim için, normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip normal kanatlı bireylerinden 40 adet bireyin kanat preparatları çift olarak hazırlanmıştır. Her bir derişimin için 80 kanat ışık mikroskopunda 40X büyütmede sayılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Bu çalışmada ulaşılan veriler toplamda 3840 kanadın ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucunda elde edilmiştir.

4.1.1. Normal metabolik aktiviteye sahip bireyler

4.1.1.1. Negatif ve pozitif kontrol grupları

Bu tez çalışmasında Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının konsantrasyonları %3'lük Aseton ile çözündürülerek hazırlandığı için çalışmada %3'lük Aseton ve distile su negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasında hazırlanan kanat preparatında 80 kanatta 23 adet küçük tek tip klon, 6 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplamda 29 adet klon belirlenmiş fakat ikiz klona rastlanılmamıştır. Kanat preparatında *flare* gözlenmediği için toplam *mwh* klon sayısı ve toplam klon sayısı da 29 adet olarak bulunmuştur. Klon indüksiyon frekansı ise distile su uygulaması için 1.49 olarak hesaplanmıştır.

%3'lük Aseton uygulanan kanat preparatları incelendiğinde 80 kanatta, 34 adet küçük tek tip klon, 4 adet büyük tek tip klon, ikiz klona rastlanılmamış, 38 adet toplam *mwh* klon ve 38 adet toplam klon belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansı ise %3'lük Aseton uygulaması için 1.95 olarak hesaplanmıştır. Tetramethrin, S-bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun, çözüsü olan %3'lük Asetonda kontrol grubu distile suya oranla klon sayısında artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı pozitif sonuç gözlenmemiştir.

Yaptığımız çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak genotoksik etkisi bilinen EMS (etil metansülfonat) kullanılmıştır. EMS uygulamalarının sonuçları negatif kontrol grupları %3'lük Aseton ve distile su ile karşılaştırıldığında küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klon olmak üzere tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

4.1.1.2. Tetramethrin tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

Tetramethrin'in çözdürme işlemlerinde %3'lük Aseton içerisinde yapıldığı için istatistiksel değerlendirmelerde negatif kontrol grubu olarak %3'lük Aseton kullanılmıştır. Tetramethrin uygulama sonuçları kontrol grubu olan %3'lük Aseton ile karşılaştırıldığında 1 ve 25 ppm Tetramethrin uygulamasında ikiz klonlarda, 50 ppm Tetramethrin'in büyük tek tip klonunda mutant klon sayısının kontrol grubuna göre bir miktar arttığı ancak kontrol grubuna çok yakın bir değer olduğu için istatistiksel olarak önemli olmadığı, diğer tüm dozlarının küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından tüm uygulanan dozlarında mutant klon sayısının biraz azaldığı gözlenmiştir. Tetramethrin'in uygulanan bütün dozlarında tüm parametreleri açısından istatistiksel olarak önemli bir sonuç gözlenmemiştir (Çizelge 4.1).

4.1.1.3. S-Bioallethrin tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

S-Bioallethrin için de çözücü kontrol olarak %3'lük Aseton kullanılmıştır. S-Bioallethrin uygulama sonuçlarının istatistiksel analizleri sonucu; 0.1, 5 ve 50 ppm S-bioallethrin dozlarının uygulaması sonucunda büyük tek tip klon sayısında ve 1, 5 ve 50 ppm S-bioallethrin dozlarının uygulaması ile ikiz klon sayısında mutant klonların sayısının bir miktar artış gözlenmiş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür. S-bioallethrinin diğer tüm dozlarının tüm parametrelerinde negatif olduğu görülmüştür ancak kontrol grubunun frekans değerlerine yakın frekanslar gözlenmiş olduğu için istatistiki açıdan önemli bir sonuca rastlanılmamıştır (Çizelge 4.1).

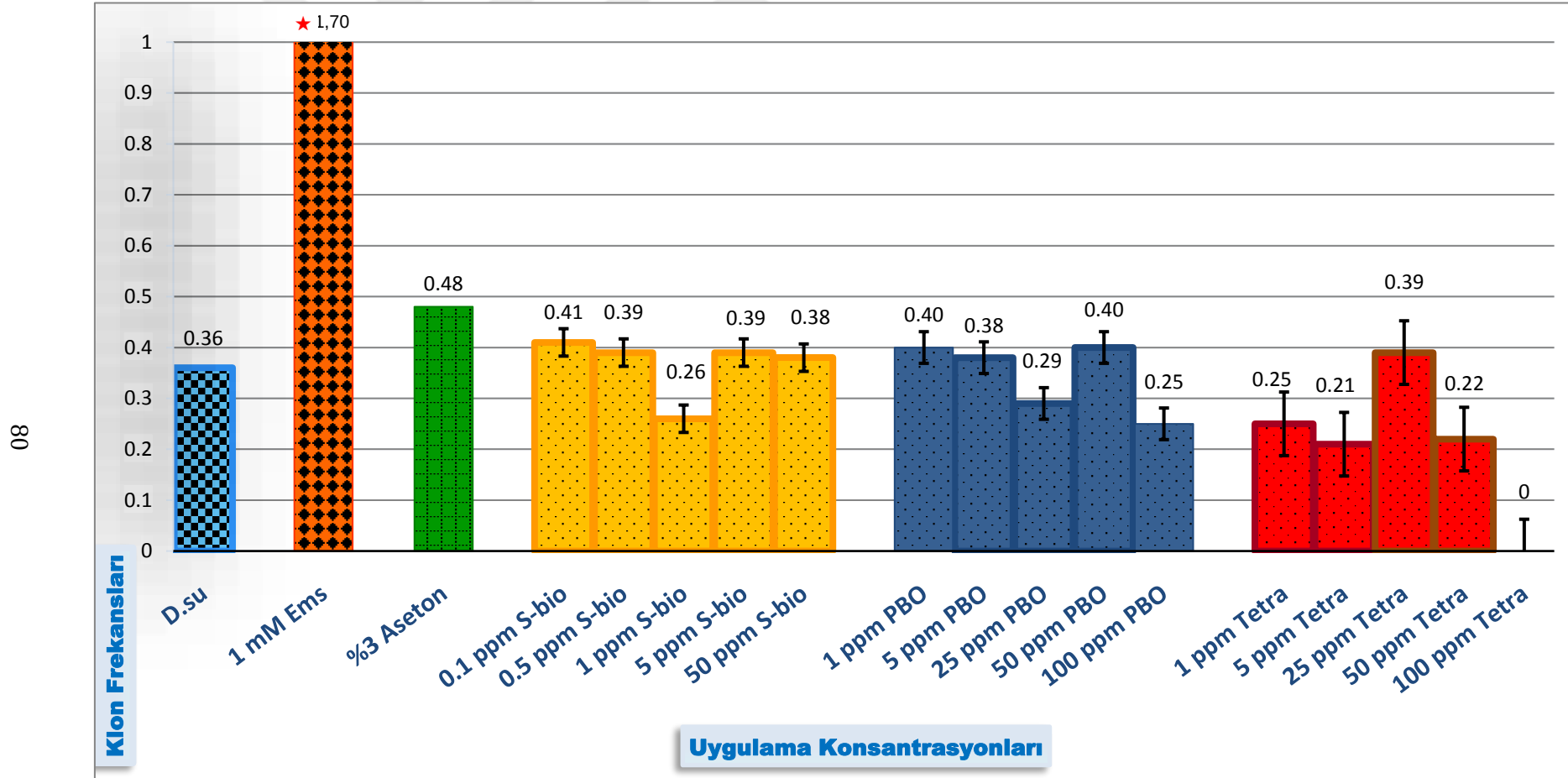
4.1.1.4. Piperonil bütoksit (PBO)'nun tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

Piperonil bütoksit (PBO)'nin çalışılan bütün derişimlerinden elde edilen sonuçlar kontrol grubunun sonuçları ile birlikte incelendiğinde 1 ve 50 ppm PBO'nun büyük tek tip klonları ile 1 ve 5 ppm PBO' nun ikiz klon sayısında mutant klonların sayısında bir miktar artış gözlenmiş ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı görülmüştür. Uygulanan diğer bütün dozlarının tüm parametrelerinde negatif sonuç gözlenmiştir. Kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın çıkmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri

Derişimler (ppm)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonlar (<i>m</i> =2)			Toplam klonlar (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su (72h)	80	23	(0.29)	-	6	(0.08)	i	0	(0.00)	i	29	(0.36)	-	29	(0.36)	-	1,49
1 mM EMS (72h)	80	90	(1.13)	+	41	(0.51)	+	5	(0.06)	+	136	(1.70)	+	136	(1.70)	+	6,97
%3 Aseton (72h)	80	34	(0.42)	i	4	(0.05)	-	0	(0.00)	i	38	(0.48)	i	38	(0.48)	i	1,95
72±4 h S-bioallethrin dozları (ppm)																	
0.1	80	25	(0.31)	-	8	(0.10)	i	0	(0.00)	i	33	(0.41)	-	33	(0.41)	-	1,69
0.5	80	30	(0.38)	-	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	31	(0.39)	-	32	(0.40)	-	1,59
1	80	19	(0.24)	-	1	(0.01)	-	1	(0.01)	i	21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1,08
5	80	24	(0.30)	-	5	(0.06)	i	3	(0.04)	i	31	(0.39)	-	32	(0.40)	-	1,59
50	80	21	(0.26)	-	6	(0.08)	i	3	(0.04)	i	30	(0.38)	-	30	(0.38)	-	1,54
72±4 h PBO dozları (ppm)																	
1	80	24	(0.30)	-	7	(0.09)	i	1	(0.01)	i	32	(0.40)	-	32	(0.40)	-	1,64
5	80	27	(0.34)	-	2	(0.02)	-	1	(0.01)	i	30	(0.38)	-	30	(0.38)	-	1,54
25	80	21	(0.26)	-	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1,18
50	80	26	(0.32)	-	6	(0.08)	i	0	(0.00)	i	32	(0.40)	-	32	(0.40)	-	1,64
100	80	17	(0.21)	-	3	(0.04)	-	0	(0.00)	i	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1,02
72±4 h Tetramethrin dozları (ppm)																	
1	80	17	(0.21)	-	2	(0.02)	-	1	(0.01)	i	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1,02
5	80	14	(0.18)	-	3	(0.04)	-	0	(0.00)	i	17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0,87
25	80	28	(0.35)	-	2	(0.02)	-	1	(0.01)	i	31	(0.39)	-	31	(0.39)	-	1,59
50	80	13	(0.16)	-	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	18	(0.22)	-	18	(0.22)	-	0,92
100	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0,00

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.1. *Drosophila melanogaster*’in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO’nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği

4.1.1.5. Tetramethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

Negatif kontrol grubu olarak kullanılan %3'lük Aseton uygulamasında 80 kanatın incelenmesinde, 34 adet küçük tek tip klon, 4 adet büyük tek tip klon, İkiz klona rastlanmamış, 38 adet toplam *mwh* klon ve 38 adet toplam klon gözlenmiştir.

Tetramethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulama sonuçları kontrol grubu olan %3'lük Aseton ile karşılaştırıldığında 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin ile 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin derişimlerinin birlikte uygulamasında küçük tek tip klon, toplam *mwh* ve toplam klon parametrelerinde mutant klon sayısında bir miktar artış olurken, 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin derişimlerinin birlikte uygulamasında büyük tek tip ve ikiz klonlarda mutant sayısında önemsiz bir artış gözlenmiştir. 25 ppm PBO + 3.125 ppm Tetramethrin parametrelerinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından tüm uygulanan dozlarında mutant klon sayısında bir azalışın olduğu gözlenmiştir. 25 ppm PBO + 3.125 ppm Tetramethrin ikiz klonun mutant klon sayısının kontrol grubuna göre artığı görülmüş fakat istatistiksel olarak önemli bir sonuç gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

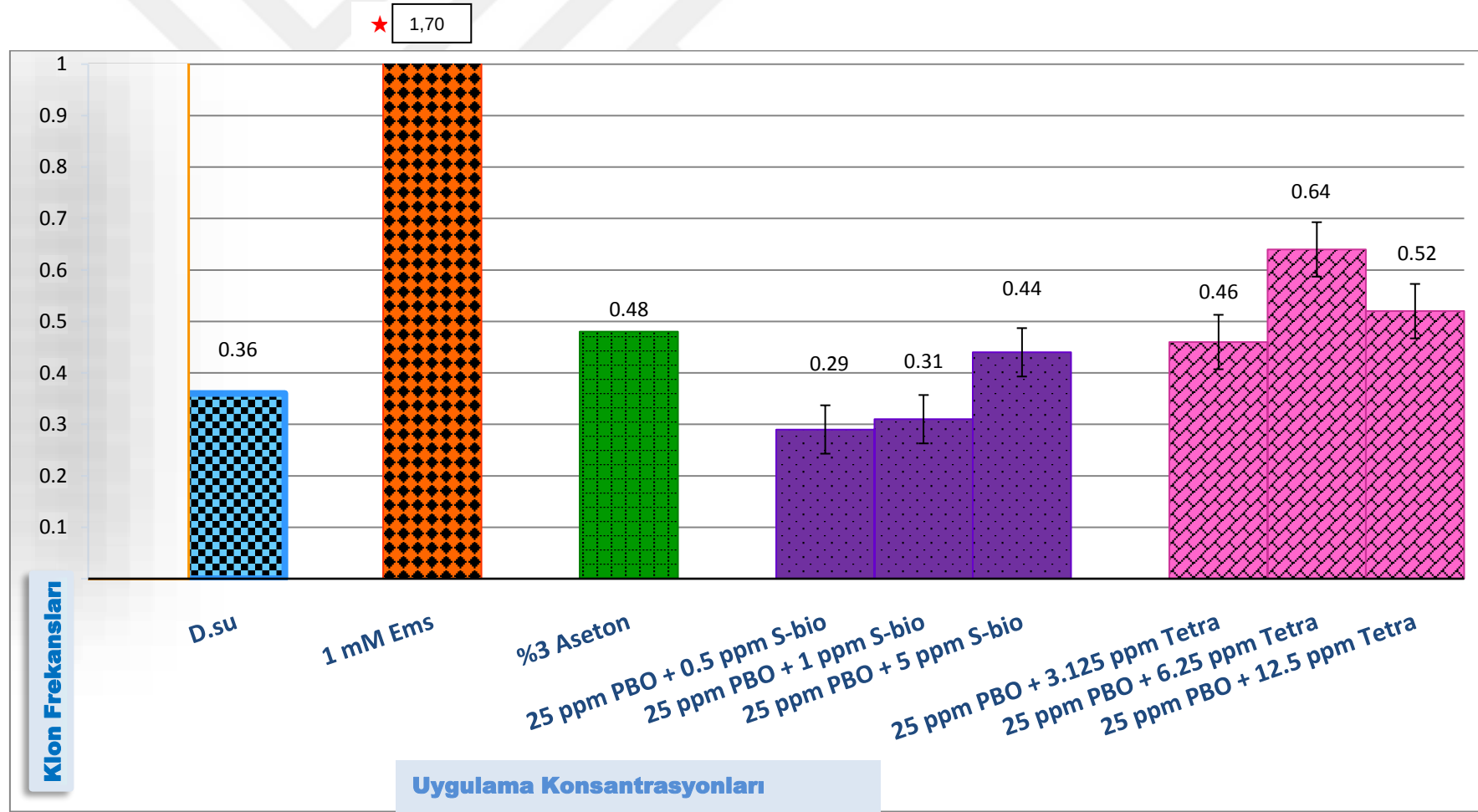
4.1.1.6. S-Bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

S-bioallethrin çözündürme işlemi sırasında %3'lük Aseton kullanıldığından negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. S-bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulama sonuçları incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında S-bioallethrin dozların parametrelerinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından mutant klon sayısında bir azalma olduğu görülmüştür. 25 ppm + 0.5 ppm S-bioallethrin büyük tek tip ve ikiz klon sayısının çok az bir artışa sahip olduğu ancak kontrol grubuna yakın frekans değerleri nedeniyle istatistiksel olarak önemli bir sonuca rastlanılmamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mh^w/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri

Derişimler (mM, ppm)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonlar (<i>m</i> =2)			Toplam klonlar (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekans _ı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su (72h)	80	23	(0.29)	-	6	(0.08)	i	0	(0.00)	-	29	(0.36)	-	29	(0.36)	-	1,49
1 mM EMS (72h)	80	90	(1.13)	+	41	(0.51)	+	5	(0.06)	+	136	(1.70)	+	136	(1.70)	+	6,97
%3 Aseton (72h)	80	34	(0.42)	i	4	(0.05)	-	0	(0.00)	-	38	(0.48)	i	38	(0.48)	i	1,95
72±4 h PBO + S-bioallethrin dozları (ppm)																	
25 ppm + 0.5 S-bio	80	17	(0.21)	-	5	(0.06)	i	2	(0.02)	i	23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1,18
25 ppm + 1 S-bio	80	23	(0.29)	-	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	25	(0.31)	-	25	(0.31)	-	1,28
25 ppm + 5 S-bio	80	32	(0.40)	-	4	(0.05)	i	0	(0.00)	i	35	(0.44)	-	36	(0.45)	-	1,79
72±4 h PBO + Tetramethrin dozları (ppm)																	
25 ppm + 3.125 Tetra	80	32	(0.40)	-	2	(0.02)	-	3	(0.04)	i	37	(0.46)	-	37	(0.46)	-	1,90
25 ppm+ 6.25 Tetra	80	40	(0.50)	i	10	(0.12)	i	1	(0.01)	i	51	(0.64)	i	51	(0.64)	i	2,61
25 ppm+ 12.5 Tetra	80	40	(0.50)	i	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	42	(0.52)	i	42	(0.52)	i	2,15

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.2. *Drosophila melanogaster*’in 72 ± 4 saatlik normal metabolik aktiviteye sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO’nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği

4.1.2. Yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireyler

4.1.2.1. Negatif ve pozitif kontrol grupları

Bu tez çalışmasında Tetramethrin, S-bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO) %3'lük Aseton ile çözülürölerek birlikte uygulamalarının konsantrasyonları hazırlandığı için çalışmada %3'lük Aseton ve distile su negatif kontrol grubu olarak değlerlendirilmiştir.

Negatif kontrol grubu olan distile su uygulamasında hazırlanan kanat preparatında 80 kanatta 19 adet küçük tek tip klon, 1 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplamda 20 adet *mwh* ve toplam klon belirlenmiş fakat ikiz klona rastlanmamıştır. Kanat preparatında *flare* gözlenmemiştir. Klon indüksiyon frekansı ise distile su uygulaması için 1.02 olarak hesaplanmıştır.

%3'lük Aseton uygulanan kanat preparatları incelendiğinde 80 kanatta, 38 adet küçük tek tip klon, 5 adet büyük tek tip klon, İkiz klona rastlanılmamış, 43 adet toplam *mwh* klon ve 43 adet toplam klon belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansı ise %3'lük Aseton uygulaması için 2.20 olarak hesaplanmıştır. Tetramethrinin, S-bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun, çözüsü olan %3'lük Aseton kontrol grubu distile suya oranla tüm dozların parametrelerinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından genotoksisteyi indüklediği gözlenmiştir.

Genotoksik etkisi kanıtlanmış olan EMS çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. EMS uygulamalarının sonuçları negatif kontrol grupları %3'lük Aseton ve distile su ile karşılaştırıldığında küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klon olmak üzere tüm klon tiplerinde pozitif sonuçlar gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

4.1.2.2. Tetramethrin tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster'* de genotoksik etkileri

Tetramethrin çözölme işlemlerinde %3'lük Aseton kullanıldığından değlerlendirmelerde negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. %3'lük Aseton uygulamasında 80 kanatın incelenmesinde, 38 adet küçük tek tip klon, 5 adet büyük tek tip klon, İkiz klona rastlanmamış, 43 adet toplam *mwh* klon ve 43 adet toplam klon belirlenmiştir. Tetramethrin uygulama sonuçları kontrol grubu olan %3'lük Aseton ile karşılaştırıldığında 1 ve 50 ppm Tetramethrin dozunda büyük tek tip klonda mutant klon sayısında artma olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu mutant klon frekansıyl a sayısal açıdan farkın az olmasından dolayı istatistiki açıdan bir fark görölmemiştir. Diğer tüm dozların parametrelerinin küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından diğer tüm uygulanan dozlarında önemli bir

artış gözlenmiştir ancak kontrol grubuna yakın bir değerde olduğu için önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.3).

4.1.2.3. S-Bioallethrin tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*' de genotoksik etkileri

S-bioallethrin çözünmesi sırasında %3'lük Aseton kullanıldığından negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. S-bioallethrin uygulama sonuçları incelenerek kontrol grubu olan %3'lük Aseton ile karşılaştırıldığında S-bioallethrin uygulanan tüm dozların parametrelerinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametrelerinde mutant klon bakımından bir artış olduğu görülmüştür. Uygulanan tüm S-bioallethrin dozların birbirine ve kontrol grubuna yakın değerlerde olması açısından ve klon indüksiyonunun frekansı bakımından yakın frekanslarda olduğu görülmüş bu nedenle istatistiksel olarak önemli bir sonuca rastlanılmamıştır (Çizelge 4.3).

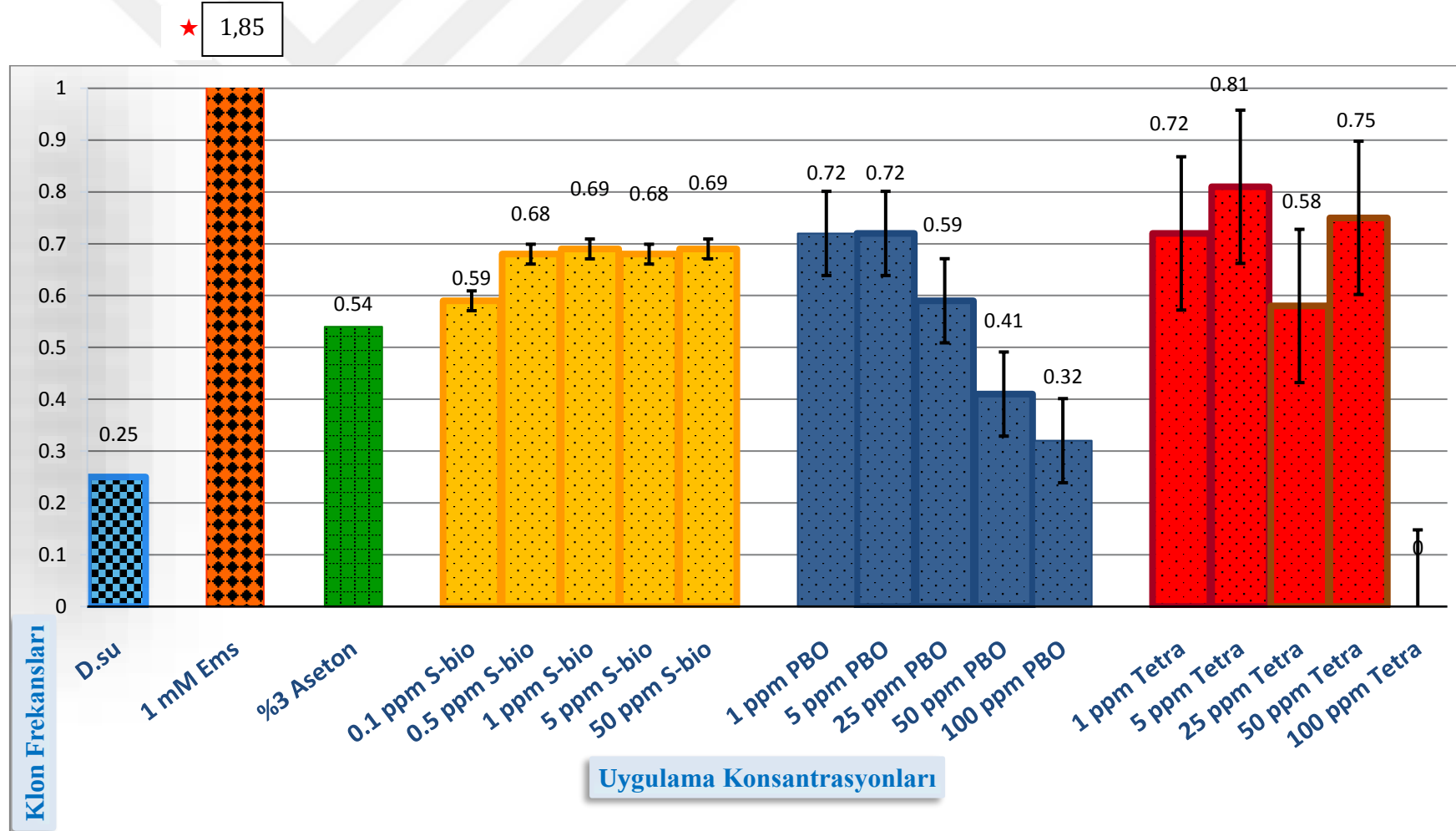
4.1.2.4. Piperonil bütoksit (PBO)' nun tek başına uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*' de genotoksik etkileri

PBO'nun çalışılan bütün derişimlerinden elde edilen sonuçlar kontrol grubunun sonuçları ile birlikte incelendiğinde 1 ppm PBO'nun büyük tek tip klon sayısında azalma görülürken diğer parametreler ile 5 ppm PBO'nun tüm parametrelerinde bir miktar artış görülmüş ancak istatistiksel bir farka rastlanılmamıştır. 25 ppm PBO'nun küçük tek tip klon sayısında azalma diğer tüm parametreler bakımından mutant klon sayısında artış gözlenmiştir. 50 ve 100 ppm PBO'nun tüm parametrelerinde kontrol grubuna göre mutant klon sayısının azaldığı görülmüştür. PBO'nun uygulanan bütün dozlarının tüm parametrelerinde önemli bir farkın çıkmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye sahip (NORR) bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri.

Derişimler (mM,ppm)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su (72h)	80	19	(0.24)	-	1	(0.01)	-	0	(0.00)	i	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1,02
1 mM EMS (72h)	80	94	(1.18)	+	54	(0.68)	+	0	(0.00)	i	148	(1.85)	+	148	(1.85)	+	7,58
%3 Aseton (72h)	80	38	(0.48)	+	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	43	(0.54)	+	43	(0.54)	+	2,20
72±4 h S-bioallethrin dozları (ppm)																	
0.1	80	39	(0.49)	i	8	(0.10)	i	0	(0.00)	i	47	(0.59)	i	47	(0.59)	i	2,41
0.5	80	43	(0.54)	i	11	(0.14)	i	0	(0.00)	i	54	(0.68)	i	54	(0.68)	i	2,77
1	80	46	(0.58)	i	10	(0.12)	i	0	(0.00)	i	55	(0.69)	i	56	(0.70)	i	2,82
5	80	49	(0.61)	i	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	54	(0.68)	i	54	(0.68)	i	2,77
50	80	47	(0.59)	i	8	(0.10)	i	0	(0.00)	i	55	(0.69)	i	55	(0.69)	i	2,82
72±4 h PBO dozları (ppm)																	
1	80	55	(0.69)	i	3	(0.04)	-	0	(0.00)	i	58	(0.72)	i	58	(0.72)	i	2,97
5	80	51	(0.64)	i	7	(0.09)	i	0	(0.00)	i	58	(0.72)	i	58	(0.72)	i	2,97
25	80	36	(0.45)	-	11	(0.14)	i	0	(0.00)	i	47	(0.59)	i	47	(0.59)	i	2,41
50	80	28	(0.35)	-	4	(0.05)	-	1	(0.01)	i	33	(0.41)	-	33	(0.41)	-	1,69
100	80	25	(0.31)	-	2	(0.02)	-	0	(0.00)	i	26	(0.32)	-	27	(0.34)	-	1,33
72±4 h Tetramethrin dozları (ppm)																	
1	80	50	(0.62)	i	8	(0.10)	i	0	(0.00)	i	58	(0.72)	i	58	(0.72)	i	2,97
5	80	60	(0.75)	i	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	65	(0.81)	i	65	(0.81)	i	3,33
25	80	43	(0.54)	i	3	(0.04)	-	0	(0.00)	i	46	(0.58)	i	46	(0.58)	i	2,36
50	80	53	(0.66)	i	7	(0.09)	i	0	(0.00)	i	60	(0.75)	i	60	(0.75)	i	3,07
100	0	0	0	-	0	0	-	0	(0.00)	-	0	0	-	0	0	-	

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.3. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun tek başına uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği

4.1.2.5. Tetramethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

Negatif kontrol grubu olarak kullanılan %3'lük Aseton uygulamasında 80 kanatın incelenmesinde, 38 adet küçük tek tip klon, 5 adet büyük tek tip klon, İkiz klona rastlanmamış, 43 adet toplam *mwh* klon ve 43 adet toplam klon belirlenmiştir.

Tetramethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulama sonuçları kontrol grubu olan %3'lük Aseton ile karşılaştırıldığında 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin ile 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin derişimlerinin birlikte uygulamasında küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon parametreleri açısından mutant klon sayısı bakımından kontrol grubuna göre bir miktar artma gözlenirken, ikiz tip klona rastlanılmamıştır. 25 ppm PBO + 3.125 ppm Tetramethrin büyük tek tip klonda artış görölmüş fakat diğer tüm parametrelerinde azalma olduğu görölmüştür. Tetramethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulamadan elde edilen sonuçların mutant klon frekansı açısından kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

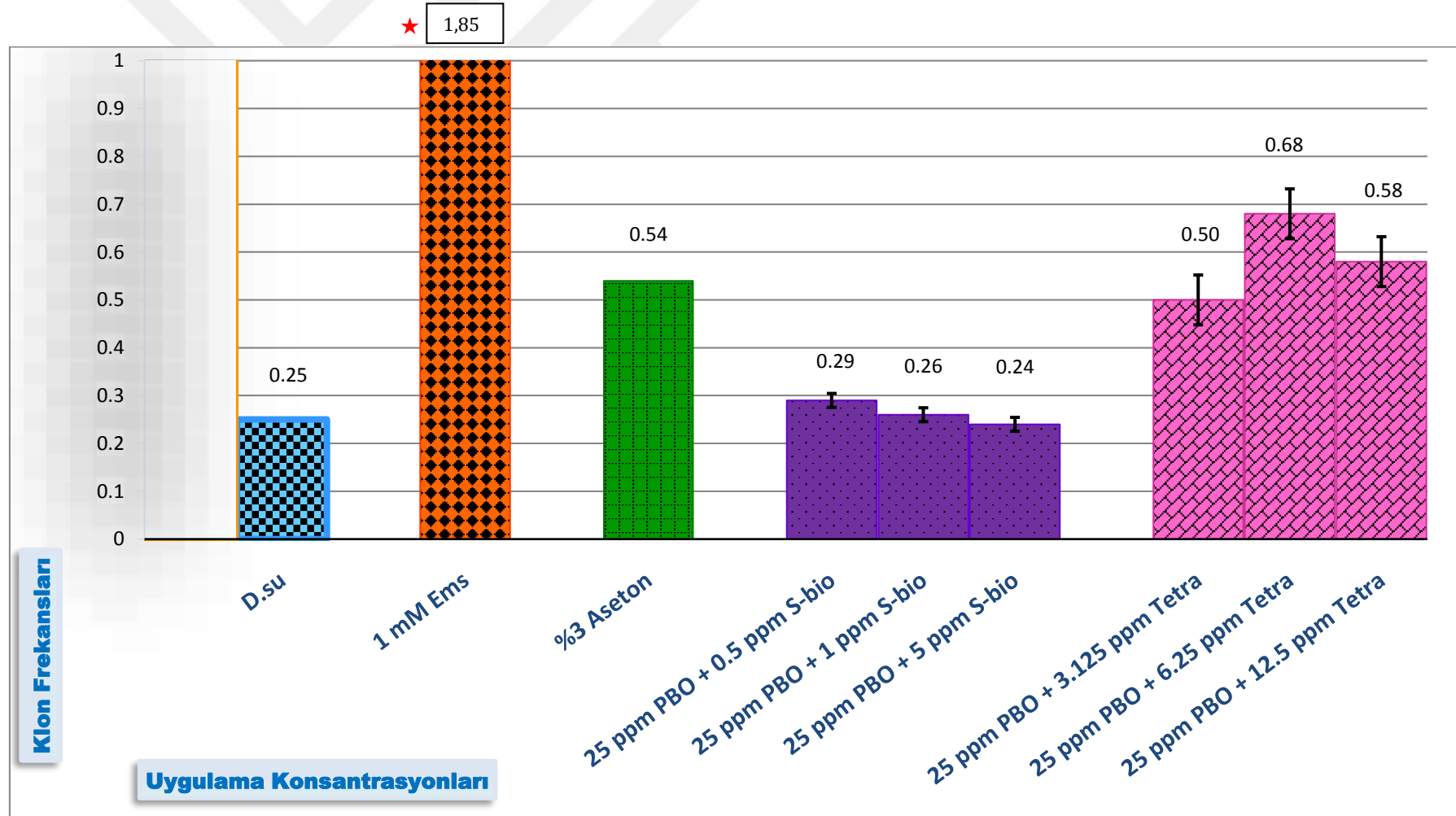
4.1.2.6. S-Bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulanan dozlarının *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkileri

S-Bioallethrin çözünmesi sırasında %3'lük Aseton kullanıldığından negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. S-Bioallethrin ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun birlikte uygulama sonuçları incelenerek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm dozların parametrelerinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam *mwh* klon ve toplam klon kategorileri açısından mutant klon sayısı bakımından kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde mutant klon sayısında azalma olduğu görölmesine rağmen istatistiki olarak önemli bir farklılığa rastlanılmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri

Derişimler (mM,ppm)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonlar (m=2)			Toplam klonlar (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁵ hücre)
		No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	No.	Fr.	D.	
Normal Kanat																	
Distile Su (72h)	80	19	(0.24)	-	1	(0.01)	-	0	(0.00)	i	20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1,02
1 mM EMS (72h)	80	94	(1.18)	+	54	(0.68)	+	0	(0.00)	i	148	(1.85)	+	148	(1.85)	+	7,58
%3 Aseton (72h)	80	38	(0.48)	+	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	43	(0.54)	+	43	(0.54)	+	2,20
72±4 h PBO + s-bioallethrin dozları (ppm)																	
25 ppm + 0.5 S-bio	80	22	(0.28)	-	1	(0.01)	-	0	(0.00)	i	23	(0.29)	-	23	(0.29)	-	1,18
25 ppm + 1 S-bio	80	17	(0.21)	-	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	21	(0.26)	-	22	(0.28)	-	1,08
25 ppm + 5 S-bio	80	19	(0.24)	-	0	(0.00)	-	0	(0.00)	i	19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0,97
72±4 h PBO + Tetramethrin dozları (ppm)																	
25 ppm + 3.125 Tetra	80	34	(0.42)	-	6	(0.08)	i	0	(0.00)	i	40	(0.50)	-	40	(0.50)	-	2,05
25 ppm + 6.25 Tetra	80	47	(0.59)	i	7	(0.09)	i	0	(0.00)	i	54	(0.68)	i	54	(0.68)	i	2,77
25 ppm + 12.5 Tetra	80	39	(0.49)	i	7	(0.09)	i	0	(0.00)	i	46	(0.58)	i	46	(0.58)	i	2,36

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi; +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m= çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 4.4. *Drosophila melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik yüksek metabolik aktiviteye (NORR) sahip bireylerinin transheterozigot larvalarının normal kanatlı bireylerinde (*mhw/flr³*) Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun birlikte uygulamalarının genotoksik etkileri grafiği

5. TARTIŞMA

Sentetik piretroidler (SP), günümüzde Dünya çapında kullanımda en yaygın olan pestisitler arasındadır. Piretroidler tarımda, ormancılıkta, bahçecilikte, halk sağlığında ve kapalı ev kullanımına yönelik birçok böcek kontrol ürününde aktif maddeler olarak kullanılmaktadır (Feo vd. 2010). Piretrin ve piretroidler, organofosfatlar ve karbamatlar gibi daha zararlı insektisitlerin terk edilmesi nedeniyle küresel olarak kullanılan başlıca insektisitlerdir (US EPA 2011).

Yeni ve güçlü pestisit formülasyonları sürekli artan Dünya nüfusuna paralel olarak zararlıların kontrol altına alınması, hijyenik kontroller ve daha fazla gıda ihtiyacı nedeniyle artmaktadır. Pestisitler tarım ürünlerinin geliştirilmesi ve bulaşıcı hastalıkların kontrol edilmesi yoluyla insan yaşamına büyük ölçüde fayda sağlamış olsa da, bunların yaygın kullanımı, insan sağlığını mesleki ve çevresel maruziyetlerle etkilemektedir. Böcek ilacıyla uzun süreli temas sinir, endokrin, bağışıklık, üreme, böbrek, kardiyovasküler ve solunum sistemi dahil olmak üzere vücuttaki farklı organların işlevini bozabilir ve insan hayatına ciddi zararlar verebilir. Bu bağlamda, pestisitlere maruz kalmanın insan kronik hastalıklarına, kanser, parkinson, alzheimer, multipl skleroz, diyabet, yaşlanma, kardiyovasküler ve kronik böbrek hastalığı da dahil olmak üzere bir çok hastalığın ortaya çıkmasıyla ilgili kanıtlar bulunmaktadır (Abdollahi vd. 2004c; De Souza vd. 2011; Mostafalou ve Abdollahi 2012a).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların çoğu, bazı pestisitlerin genomik toksisite üretme kabiliyetlerini göstermiştir (George ve Shukla 2011). Bu genotoksisite, uzun süreli maruziyet nedeniyle kanserojen, nörolojik ve reproduktif süreçler gibi yıllar boyunca etkileri tetikleyecek birincil risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Pestisitlerin kullanımından kaynaklanan mutajenik ve mutajenik olmayan süreçlerden dolayı genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bazı çalışmalar, pestisitlerin sitogenetik etkilerinden dolayı maruz kalan popülasyonlardaki mesleki maruziyet ve bazı proto-onkogenler arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Bolognesi vd. 2011; George ve Shukla 2011).

Yaygın kullanımları insektisitlere karşı böceklerin direnç kazanmalarına sebep olmaktadır. Böceklerde direnç ile ilgili enzimler Esterazlar, Glutation, S-transferazlar, P450 Monoksijenazlar ve Hidrolazlar en çok bilinenleridir (Çakır ve Yamanel 2005). Böceklerde enzimlerin yetersiz olduğu durumda insektisitlerin böceklerde başlıca hedefi sinir sistemine yönelik olan toksisitesinden kaynaklanmaktadır. Böceklerde insektisit toksisitesi sodyum, kalsiyum kanalları ve asetil kolin inhibe edilmesi ayrıca oksidatif stres kaynaklı ROS oluşumu ile DNA hasarından kaynaklanmaktadır (Çaylak 2011).

Doğrudan ya da dolaylı olarak olarak kimyasal, fiziksel ya da biyolojik ajanlarla etkileşim sonucu genetik materyalin zarar görmesi gerçekleşmektedir (Brusick 1980). Genetik materyaldeki değişikliklere neden olan ajanlar çeşitli genotoksisite test yöntemleri ile belirlenebilmektedir.

Bu genotoksisite testleri direk ya da indirek olarak genetik materyalde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hasara neden olan bileşiklerin saptanması için geliştirilmiş *in vivo* ve *in vitro* testlerden oluşmaktadır (Young 2002; Alkan ve Anlaş 2015). *In vivo* ve *in vitro* testlerin yapıldığı model organizmaların insan genomu ile karşılaştırıldığında homolojisi oldukça yüksek ancak genom boyu küçük olan canlılardır ve insan üzerinde çalışılması mümkün olmayan her türlü deneyde kullanılabilirler (Kutluyer ve Aksakal 2013). Bu bağlamda tez çalışmamız kapsamında kullanılan kimyasalların *in vivo* olarak genotoksik potansiyelerinin değerlendirilebilmesinde insanlarla homoloji yönünden büyük benzerlik gösteren ökaryotik bir model organizma olan *D. melanogaster* kullanılmıştır.

SMAR testinin en önemli özelliklerinden biri eksojen bir metabolik aktivasyon sistemi gerekmeksizin promutajenlerin genotoksik aktivitesini tespit etme kapasitesine sahip olmasıdır. *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanıldığı birçok genotoksisite testi bulunmaktadır, ancak *Drosophila* SMART bir çok genetik sonucun aynı anda belirlenmesinde kullanılan *in vivo* bir test olması, ucuz, hızlı ve ökaryotik bir organizmanın model olarak kullanılıyor olması bakımından son yıllarda yaygın kullanılan bir yöntemdir.

Bu tez çalışmamızda kullanılan kimyasallardan Tip I piretroid Tetramethrin'in normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde genotoksisiteye etkileri *Drosophila* SMAR testi kullanılarak kanat preparatlarının değerlendirilmeleri sonucunda elde edilen verilere göre tespit edilmiştir. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde kontrol grubuna göre Tetramethrin'in tüm dozlarında küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klon parametreleri bakımından genotoksisiteyi inhibe ettiği gözlenmiştir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde ise kontrol grubuna göre Tetramethrin'in tüm dozların parametreleri açısından genotoksisiteyi indüklediği gözlenmiş ancak kontrol grubu değerlerine yakın bir değere sahip olduğu için genotoksisite tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda Tetramethrin için elde ettiğimiz veriler doğrultusunda genotoksisiteyi inhibe ettiği yönünde gözlemlediğimiz sonuçların literatürde bulunan bazı çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmektedir.

Badarinath (2006) çalışmasında Swiss Albino farelerinde Tetramethrin'i 24 saat ara ile 2 x 200 mg/kg oral olarak uygulamış ve memeli eritrositlerinde Mikronükleus test yöntemi ile yaptıkları analizlerde negatif sonuçlar gözlemlemiştir. Murli vd. (1992) yaptıkları çalışmada Tetramethrin'i IRC farelerine 500, 1000 ve 2000 mg/kg dozlarında uygulamışlar ve ardından 6, 18 ve 30 saat sonra bireylerden enjeksiyon ile aldıkları numunelerin kromozomal aberasyon testi sonucunda Tetramethrin'in tüm dozlarında genotoksisiteyi artıran bir etki gözlemlemişlerdir. Sato vd. (1980b) çalışmalarında SD sıçanlarına gebeliğin 7-17. günlerinde 1000, 3000 ve 4000 mg/kg Tetramethrin'i oral olarak uygulamışlar ve fetüsler ile yavruların büyümesi üzerinde Tetramethrin'in

fetuslarda embriyo öldürücü, büyüme inhibisyonu ve teratojenik etkileri gibi anormallikler saptamamışlar ve Tetramethrin'in doğumdan sonra büyüme ve üreme kabiliyeti üzerine olumsuz hiçbir etkisine rastlamamışlardır.

Yoshitake vd. (1987) yaptıkları çalışmada Tetramethrin'in 100-5000 µg/plaka ile *S.typhimurium*' un TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537, TA 97 suşları ve *E. coli*' de AMES testi ile mutajenitesini araştırmışlardır. Çalışmanın sonunda mutajenik etki bakımından negatif değer elde etmişler ve Tetramethrin'in mutajenik olmadığı sonucuna ulaşmışlardır.

Miyatomo (1976) tarafından yapılan çalışmada 10-15 hamile yeni Zelanda beyaz tavşanlarına Tetramethrin'i oral olarak 30 ve 90 mg/kg dozlarında 6-18 gün boyunca uygulama yapmışlar çalışma boyunca bireylerin dış görünüş ve iskelet yapıları bakımından Tetramethrin'in hiçbir şekilde bireylerde olumsuz etkilerinin olmadığını gözlemlememişlerdir.

Bizim çalışmamızda normal metabolik aktiviteye sahip bireylere yapılan uygulamadan elde edilen sonuçlarda Tetramethrin'in genotoksik etki göstermediği diğer taraftan yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde gözlenen klon frekansı kontrol grubuna göre nispeten artmış olarak görünse de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Literatür bilgilerine bakıldığında yapılan bazı çalışmalarda Tetramethrin'in genotoksisiteyi indükleyebilme potansiyeline sahip olduğu yönünde sonuçlarında elde edildiği görülmektedir.

Pestisitler hedeflerine göreceli olarak özgül olmalarına rağmen, hedeflenmemiş organizmaları etkileyebilirler ve özellikle farklı tarımsal faaliyetlerde bulunan bireyler için uygulama alanları etrafındaki nüfus için tehlikelidirler. Bu durum, kişisel koruyucu ekipmanların kullanılmadığı ve mevzuat kurallarının uygulanmadığı gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde daha da kötüdür. Bu durumu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur.

Tayyaba vd. (2018) çalışmalarında Pakistanın en önemli pamuk yetiştirme bölgesi Pencap eyaleti Bahawalpur bölgesinde çıplak ellerle pamuk toplarken Tetramethrin'inde aralarında bulunduğu pestisitlere maruz kalan kadınlarda DNA hasarını KOMET testini kullanarak değerlendirmişlerdir. Bölgede çalışan kadın işçilerden rastgele seçilmiş 138 kişiyi 69'u kontrol grubu diğer 69 'u günde 5-9 saat olmak üzere 5 ay boyunca maruz kalan kişilerden seçmişler ve kan örneklerinin tahlili sonucunda DNA hasarını maruz kalan grupta kalmayanlara göre daha yüksek olduğunu kanıtlamışlardır. Bu çalışma ile pestisitlere maruz kalmanın DNA hasarına yol açtığını göstermişlerdir.

Yurdakök Dikmen vd. (2017) yaptıkları çalışma ile son zamanlarda kolinesteraz inhibitörlerin yerine piretroidlerin kullanımının arttığı bu nedenle sentetik piretroidlerden Permethrin, Cypermethrin, Tetramethrin ve Deltamethrinin RTG-2 alabalık hücreleri üzerinde hücresel ve hücre içi etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada

parçalanmış hücre ve yoğun çekirdekler, hücre iskeletinde delik formasyonu ve fragmanlar, piknotik çekirdekler, mikronükleus oluşumu, hücrelerin ve çekirdeklerin büzülmesini değerlendirmeleri sonucunda RTG-2 hücrelerinde kullandıkları piretroit pestisitlerin Tip 1 ve Tip 2 sınıf ayrımı yapmaksızın hepsinin kesin olarak apoptosisi başlattığını kanıtlamışlardır.

Tetramethrin'e potansiyel olarak çevrede maruz kalma durumunda ortaya çıkmaktadır. Çevrede bulunan bu kimyasalların maruziyeti hormonal olarak etkilemesi sonucu ciddi sağlık sorunlarıyla karşılaşmaktadır. Ündeğer ve Başaran (2002) çalışmalarında Türkiye'de Ankara Belediyesinde çalışan 33 böcek ilacı işçisinin en az 1 yıl pestisitlere maruz kalması sonucunda bu işçilerin periferik lenfositlerindeki DNA hasarı, "kuyruklu yıldız" yani KOMET testi tekniği olan alkalik tek hücreli jel elektroforezi ile araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda İşçilerin lenfositlerinde gözlenen DNA hasarını kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Sümer vd. (1990) yaptıkları çalışmada 4 böcek öldürücünün, Biyoallethrin, Tetramethrin, Propoksür, Metan ve bu kimyasalların üç ticari formülasyonunun, formülasyon I, formülasyon II'nin mutajenik etkileri, standart bir *Salmonella typhimurium* testinde TA 98 ve TA 100 suşlarının kullanılmasıyla belirlemişlerdir. Bioallethrin, Propoxur, formülasyon I sadece *S. typhimurium* TA 98 suşu üzerinde zayıf mutajenik etkiler gösterirken, TA 100 ve TA 98 *S. typhimurium* suşlarında zayıf bir mutajen olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer kimyasal Tip I piretroid S-Bioallethrin'in *Drosophila* kanat imajinal disk hücreleri üzerine olan etkilerinin normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde değerlendirilmesi yapılmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde S-Bioallethrin tüm dozlarının kontrol grubuna göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klon parametreleri bakımından genotoksik olmadığı gözlenmiştir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerden elde edilen verilerde ise S-Bioallethrin tüm dozlarında (0.1, 0.5, 1, 5 ve 50 ppm) istatistiksel önemde bir artışa rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda S-Bioallethrin değerlerinin negatif olduğu ve bu nedenle genotoksisiteyi inhibe ettiği yönünde sonuç gözlenmiştir. Artış olduğu gözlenen verilerde genotoksisiteyi indüklediği yönünde ancak kontrol grubu arasında mutant klon frekansı açısından istatistiksel bir fark görülmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda literatürde benzer sonuçlara ulaşılan çalışmaların mevcut olduğu görülmektedir.

Ray vd. (2006) çalışmalarında ulaşmak istedikleri amaç belirgin etkilere sahip olan farklı piretroid insektisitlerin sahip oldukları toksisitelerin *in vitro* yöntemlerle antagonizmi göstererek toksisiteyi artırabileceğinin her zaman mümkün olmadığını, farklı sınıfların piretroidleri arasındaki antagonizmanın *in vivo* olarak yeniden üretilip çoğalmayacağını kanıtlamaktır. Bu nedenle yaygın olarak kullanılan iki piretroid,

deltamethrin (tip II) ve S-biyoallethrin (tip I) tek başına ve birlikte kombinasyonları ile anestezi uygulanmış sıçanlara intravenöz olarak vermişlerdir. Sonuçları iki kantitatif yöntemle hipokampal dentat granül hücre inhibisyonunun uzaması ve anormal elektromiyogram akıntısının genliği ile değerlendirmişlerdir. Aynı dozlarda Deltamethrin ve S-biyoallethrin kombine uygulanması, hipokampal inhibisyonu uzattığı sonucuna ulaşırken, S-biyoallethrin elektromiyogram üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığını ayrıca Deltamethrin tarafından uyarılan anormal kas deşarjlarının genliğinde önemli bir değişiklik yaratmadığı sonucuna ulaşmışlardır. Liang vd. (2005) yaptıkları çalışmada Ulusal Standart GB15670 1995'e dayanan yöntemleri kullanarak S-biyoallethrin'i farelerde AMES testi, kemik iliği MN testi, sıçanlarda fare testi spermatositlerinde kromozom aberasyon testi ve subkronik oral toksisite testi ile mutajenliklerini, toksisitelerini incelemişler ve kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Tüm dozlarda AMES testi negatif, kemik iliği mikronükleus, kromozom aberasyon ve subkronik test sırasında, maruz bırakılan hayvanlarda belirgin toksik cevap gözlemlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda S-biyoallethrinin, uygulanan dozlar bakımından mutajenik olmayan bir pestisit olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir.

Shinoda vd. (1975) çalışmalarında 7 gün boyunca hamile TVCS farelerine S-bioallethrinini oral olarak belirli dozlarda uygulamışlar ve çalışmadan S-bioallethrin'in uygulanan dozlarının gebe sıçanların fetuslarında herhangi bir bozukluğa neden olmadığını gözlemlemişlerdir. Sato vd. (1985) yaptıkları çalışmada F344 erkek ve dişi sıçanlarını 123 hafta boyunca 125, 500 ve 2000 mg/kg D-allethrin ile beslemeleri sonucunda 500 mg aşan dozlarda glutamin aktivite, oksaloasetik ve glutamin-pirüvik asit transaminaz ve alkalın artışı, vücut ağırlığında azalma, böbrek ve karaciğerde ağırlık artışı gözlemlemişlerdir. Karaciğerde fagosit histiyoitleri görülmesine rağmen onkojenik etki gözlemlememişlerdir. Motoyama vd. (1975a) çalışmalarında S-bioallethrin'in akut toksisitesini Wistar sıçanlarında araştırmışlardır. Çalışmada 5 dişi ve 5 erkek Wistar sıçanına 90 gün boyunca S-bioallethrin vermişlerdir. Diğer bir grupta 10 dişi ve 10 erkek Wistar sıçanına 180 gün boyunca S-bioallethrin vermişlerdir. Cinsiyetler arasındaki dozlardaki farklılıklar nedeniyle bir akut toksisite çalışmasında makroskopik olarak herhangi bir anormal değişiklik gözlemlemişlerdir. Anormal septomlar ve ölümler meydana gelmediğini göstermişlerdir. S-bioallethrinin herhangi bir toksik etki oluşturmadığını kanıtlamışlardır. Sakamoto vd. (1975a) çalışmalarında JLC-ICR fareleri ve Sprague-Dawley sıçanları bir ay boyunca haftanın altı gününde ve günde 2 saat boyunca Bioallethrin konsantrasyonlarına (20, 80 ve 160 mg/m³) maruz bırakmışlardır. Sıçanlar en düşük olan konsantrasyonu iyi bir şekilde tolere etmişlerdir. 80 ve 160 mg/m³ dozlarında toksik olarak uyarılma ile kuyruk yükseltme, atlama, tükürük salgılama ve farelerde hafif titreme ve hafif salya ve sıçanlarda nazal hemoraji gözlemişlerdir. Hematolojik ve biyokimyasal testler ile mikroskopik olarak incelemede herhangi bir olumsuz sonuca rastlamamışlardır.

Çalışmamızda kullandığımız S-biyoallethrinin sonuçlarında genotoksisiteyi indirgediği saptanmıştır. S-biyoallethrin genotoksisiteyi yükseltgeme potansiyeline

sahip olduğu yönünde sonuçlarında bulunduğu bazı çalışmalar Literatür taramasında karşımıza çıkmaktadır.

Srivastava vd. (2012) Allethrin'in neden olduğu oksidatif stres kaynaklı genotoksisiteyi İsviçre albino farelerini kullanarak kromozom anormallikleri (KA) ve bir mikronükleus (MN) indüksiyon analizi kullanılarak araştırmışlardır. Farelerde DNA alkali çözme deneyi (DAUA) kullanılarak ve 8-hidroksi-2-deoksi-guanosin (8-OH-dG) seviyelerinin ölçülmesiyle Allethrin'in DNA'ya zarar veren potansiyeli gözlemiştir. Allethrin'in DNA'ya zarar veren potansiyelinin, p53, p21, GADD45 ve MDM-2'nin modülasyonu ile olduğunu ve bu sonuçların İsviçre albino farelerinde Allethrin'in genotoksik olduğunu ve pro-oksidan potansiyelinin varlığını doğruladığını kanıtlamışlardır. Selvi vd. (2011) çalışmalarında sentetik piretroid grubuna ait olan böceklerle karşı hızlı aktiviteye gösteren Esbiothrin'in ev zararlılarına karşı yaygın kullanılmasından dolayı ayrıca, ekotoksikite ve genotoksik etkileri hakkında oldukça az veri olması nedeniyle, peribiyotik kan eritrositlerinde MN ve KOMET testi kullanılarak model balık türleri *Cyprinus carpio* L.1758 üzerinde genotoksik potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre Esbiothrin'in mikronükleusların frekanslarında ve DNA iplik kopmalarının seviyelerinde önemli artışlar ortaya çıkardığını ve bu nedenle, sucul ekosistemin bir organizması olan balıklar üzerindeki genotoksik potansiyelinin olduğunu göstermişlerdir. Öztaş vd. (2015) yaptıkları çalışmalarında dört sentetik piretroid olan Allethrin, Bioallethrin, Deltamethrin ve Esbiothrin yarı inhibitör konsantrasyon (IC50) değerlerini insan hepatosellüler karsinom hücrelerinde (Hep G2) araştırmışlardır. *In vitro* test yöntemi AMES testi sonuçları baz çifti ikamesine göre mutajenitesinin zayıf bir potansiyele sahip olduğunu, KOMET testi ile değerlendirme sonuçlarının ise DNA hasarını hafif bir şekilde uyardığını saptamışlardır. Chaudhari ve Saxena (2016) çalışmalarında, Biyoallethrin ile tedavi edilen tatlı su balıkları *Channa punctatus* RBC'lerinde mikronükleus testi kullanarak mikronükleus sıklığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Deney grubundaki balıkları, (0.0025, 0.005, ve 0.010 ppm) Biyoallethrin konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar ve sonuçta etkilenen eritrositlerin, ana çekirdeğe yakın veya tamamen serbest olan sitoplazmada yuvarlak mikronükleusun ortaya çıktığını görmüşlerdir. Bu sonuçlar, balıklarda Biyoallethrin tarafından neden olunan genotoksikitenin açık bir göstergesi olduğunu kanıtlamışlardır.

Madhubabu ve Suresh (2014) çalışmalarında Allethrin'in sıçan testis karsinom hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı sitotoksitesini araştırmışlardır. Bu çalışmada, Allethrin'in Leydig hücre karsinomu hücreleri (LC540) ve sırasıyla 125 IM ve 59 IM'lik bir IC50 ile izole edilmiş birincil Leydig hücreleri üzerinde doza bağımlı bir sitotoksikite sergilediğini göstermişlerdir. Sitotoksikitenin reaktif oksijen türlerinin oluşumu, artmış lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim durumundaki değişikliklerle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Oksidatif stres, apoptoz ve kalsiyum salıverilmesine neden olmaktadır. Allethrine maruz kalanların LC540 hücrelerinin morfolojik analizleri, apoptotik cisimlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Allethrin kaynaklı apoptoz, voltaj

kapılı kalsiyum kanalı aracılı hücre içi kalsiyum salınımı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmalarının sonuçları, erkek üreme sistemindeki Allethrin toksisitesinin Leydig hücre apoptotik ölümünü içerdiğini göstermişlerdir.

Herrera ve Laborda (1988) çalışmalarında dört piretroid, Allethrin, Resmethrin, Permethrin ve Fenvaleratini *Salmonella typhimurium*'un yedi suşuna (TA1535, TA100, TA1538, TA98, TA1537, TA97 ve TA104) sahip bakteriyel reversiyon analiz sistemlerinde mutajenite için test etmişlerdir. Sonuçlara göre, sıçan karaciğer aktivasyon sisteminin varlığında veya yokluğunda, üç tiroid, yani Resmetrin, Permetrin ve Fenvaleratın *S. typhimurium*'da mutajenik olmadığını bulmuşlardır. Allethrin'in TA100, TA104 ve TA97 suşları ile mutajenik olduğu ve aktivitesini, esas olarak TA100 ve TA104 suşları ile göstermek için gerekli metabolik aktivasyon (S9 karışımı) olduğunu bulmuşlardır. Hour vd. (1998) çalışmalarında ondört pestisit mutant *Salmonella* suşlarına uygulamışlardır. Bu mutant yapılar, mutajenitesi, beta-laktamaz geninin ekspresyonunu tersine çevirme yeteneklerine dayanan *Salmonella* suşlarıdır. Ondört pestisit yeni geliştirilen baz ikamesi mutasyonlarını saptamada yararlı olan *Salmonella typhimurium* suşları JK947 ve JK3 kullanılarak, genotoksisite açısından değerlendirmişlerdir. Altı pestisit yani Allethrin, Kaptan, Folpet, Monocrotophos, Asefat ve Karbofuranı, JK947 suşunda oldukça mutajenik olduğunu, Allethrin, Kaptan, Folpet, Monocrotophos JK3 suşunda daha zayıf mutajenik olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan pestisitlerde sinerjist etki sağlayan PBO'nun *Drosophila* SMAR test sistemi kullanılarak normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerin kanat preparatlarında genotoksisite etkilerinin değerlendirilmeleri yapılmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde PBO'nun tüm dozlarının kontrol grubuna göre küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon, toplam *mwh* ve toplam klon parametreleri bakımından genotoksisite kontrol grubuna göre nispeten daha düşük olduğu gözlenmiştir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde ise kontrol grubuna göre PBO'nun tüm dozların istatistiksel önemde bir fark gözlenmemiştir.

İnsektisitlerin oksidatif metabolizmasının inhibisyonu ile çalışan PBO'nun 1960 yılında Sun ve Johnson tarafından ev sinekleri kullanılarak yapılan *in vivo* toksisite testlerine dayanmak suretiyle ilk olarak önerildiğidir. En önemli piretroid sinerjisti ve klasik bir MFO inhibitörü olan PBO'nun tüm piretroidlerin toksisitesini kanatlılar ve diğer böceklerde artırır. PBO'nun piretroidlerin etkisini 10-300 kat artırdığı belirlenmiştir. Diğer sinerjistlerde oksidaz inhibitörü olarak güçlü olsalarda ticari olarak PBO kadar bir öneme sahip değildir (Casida 1998).

Sinerjistler, aktif bileşenlerin toksisitesini arttırmak için pestisit formülasyonlarına eklenen kimyasallardır. PBO, geniş bir insektisit yelpazesine sahip bir sinerjik olarak yüksek verimliliğe sahiptir. PBO, özellikle aerosol ürünlerinde ve sivrisinek spreylerinde, piretrin ve sentetik piretroidlerin yanı sıra diğer böcek öldürücü

türlerinin gücünü arttırmak için sıklıkla kullanılır. Birçok farklı böcek ilacı formülasyonu PBO içerir (Inchem 2018).

PBO'nun negatif sonuç vermesi ile genotoksiteyi inhibe ettiği yönünde sonuca ulaşılmıştır. Genotoksiteyi indüklediği yönünde olan dozlarında kontrol grubu arasında bir fark görülmemiştir. Ayrıca literatürde sonuçlar bakımından bizim sonuçlarımızla aynı sonuçlar elde eden çalışmalar mevcuttur.

Demir vd. (2014) yaptıkları çalışmada sentetik piretroitlerden Cypermethrin, Sifenoethrin, Deltamethrin, Permethrinin tek başına ve Piperonil bütoksit (PBO)'nun farklı oranları ile oluşturulan kombinasyonlarını *D. melanogaster* SMART kullanarak genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kullanılan dört sentetik piretroitin tek başına ve PBO, ile birlikte uygulamalarının negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında genotoksik olmadığını gözlemlemişlerdir. Bunun yanında PBO'nun 1, 5 ve 25 ppm konsantrasyonlarında negatif sonuç gözlemlerine rağmen 50 ppm dozunda pozitif bir sonuç elde etmişlerdir. Osaba vd. (1999) çalışmalarında *D. melanogaster* normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerinde SMAR test yöntemi kullanarak altı insektisit, piretroid Allethrin, Metilendioksifenolik, PBO, Klorlu Hidrokarbonlar Dieldrin ve Endrin, Organofosfatlar, Dimetoat ve Malathion genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Araştırmadan elde ettikleri verilerde tüm bileşiklerin sonuçlarının negatif olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer bir çalışma ile *Drosophila* kanat nokta testinde PBO için negatif sonuç elde edilmiş ve genotoksik olmadığını gözlemlenmiştir (Tripathy vd. 1990).

Beamand vd. (1996) yaptıkları çalışma ile hassas kesilmiş insan karaciğer dilimlerinde PBO'nun programlanmamış DNA sentezi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Beş insan donöründen aldıkları doku örneklerinden elde ettikleri karaciğer dilimlerini 3H timidin ve 0-2.5 mM PBO içeren bir ortamda kültüre etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda PBO'nun kültürlenmiş insan karaciğer dilimlerinde Unscheduled DNA synthesis (Programlanmamış DNA Sentezi, UDS)'yi indüklediğini görmüşlerdir. Bununla birlikte, PBO'nun insan karaciğerinde DNA'ya zarar vermeyen, genotoksik olmayan bir ajan olduğuna dair bir kanıt sunmaktadırlar. Tayama vd. (1996) çalışmalarında farelerde hepatokarsinojenite için Safrolenin ve PBO'nun farklı konsantrasyonlarına bağlı kardeş kromatid değişimi (KKD) ve kromozomal aberasyonların (KA) indüksiyonu, sıçan karaciğeri S9 fraksiyonu olan ve olmayan CHO-K1 hücreleri kullanılarak sitogenetik etkilerini araştırmışlardır. Safrolenin ve PBO'nun SCE'lerde az ama anlamlı bir artışa neden olduğu, Safrolenin CA' larda yüksek düzeyde iken PBO'da değişmediğini göstermişlerdir. Sonuçta Safrolenin %9'luk uygulamasının genotoksik olduğu diğer dozlarının genotoksik olmadığını aynı zamanda çalışma sonucunda PBO'nun genotoksik bir etki göstermediğini kanıtlamışlardır. Butler vd. (1996) *Salmonella typhimurium* suşları TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 ile araştırmışlardır. PBO *Salmonella* mikrozom mutajenite testinde negatif sonuçlar gösterdiğini gözlemlemişler.

Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri kullanılarak da kromozomal anormallikleri araştırmışlar ve DNA üzerindeki etkilerini, sıçan karaciğer primer hücre kültürleri kullanılarak *in vitro* programlanmamış DNA sentezi (UDS) testi ile değerlendirmişlerdir. Herhangi bir analiz sisteminde PBO'nun genotoksik olmadığını göstermişlerdir. Literatür taramasında PBO sıçan karaciğeri mikrozomlarının (S9) varlığında veya yokluğunda (S9) *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*'yi içeren bir dizi bakteri tahlillerinde mutajenik aktivite kanıtı göstermemiştir (Ashwood-Smith vd. 1972; Ishidateri vd. 1984; Kawachi vd. 1980; Moriya vd. 1983; White vd. 1977). PBO genotoksitesi ile ilgili olarak, mutasyona (Lawlor 1991; White vd. 1977) ve programlanmamış DNA sentezine (Lake 1995) odaklanan sadece birkaç *in vitro* çalışma mevcuttur, ancak genotoksik etki bildirilmemiştir.

Bizim çalışmamız PBO'nun *Drosophila* SMAR testinde çalışılan dozlarda genotoksik olmadığı yönündedir. Literatür bilgilerine bakıldığında yapılan bazı çalışmalarda PBO'nun genotoksiteyi indükleyebilme potansiyeline sahip olduğu yönünde sonuçlarında elde edildiği görülmektedir.

Varvadas vd. (2016) yaptıkları çalışmada dört ay boyunca Yeni Zelanda beyaz erkek tavşanları sık kullanılan II. sınıf piretroit bir insektisit olan Cypermethrin (CY) ve sentetik piretroidlerin pestisit formülasyonunda en çok kullanılan sinerjist Piperonil bütoksit (PBO) ve bunların kombinasyonlarına düşük ve yüksek dozlarda maruz bırakmışlardır. Çalışmada genotoksite ve sitotoksite, lenfositlerdeki mikronükleus (BNMN), mikronükleus (MN) ve sitokinez blok proliferasyon indeksi (CBPI) ile ikili çekirdekli hücreler ölçümlerini yaparak sonuçları gözlemişlerdir. Hem CY hem de PBO, karaciğer ve böbrek iltihabına neden olduğunu ayrıca genotoksiteye neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Her bir maddenin toksisitesi, PBO'nun tek başına uygulandığında CY'nin etkisinden daha fazla ve çalışmada ölçülen CBPI'nin, tüm maruz kalan gruplar için genel olarak sitotoksik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. FAO / WHO (2011) PBO'nun erkek ve dişi fareler üzerindeki mutajenik etkisini *in vivo* bir çalışmada, mikronükleus analizi ile araştırmışlardır. PBO'nun mutajenik olmadığı, 2 ve 4 aylık maruziyet sonrası BNMN ve MN'nin istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği ve DNA hasarıyla sonuçlanan kümülatif stresli etki gözlemişlerdir.

Arsan vd. (2016) yaptıkları çalışmada metabolik aktivasyon sistemlerinin varlığında genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olan İmidakloprid, metabolizma modulatorlerinin PBO ve Menadionun etkisi sonucunda toksisitesinin cinsiyetle ne ölçüde ilişkili olduğunu araştırmışlardır. Erkek sıçanlar imidaklopridin genotoksik etkilerine duyarlılık göstermiş ve PBO, bu etkiyi sadece 24 saatte karşılarken, Menadion, İmidaklopridin neden olduğu genotoksiteyi şiddetlendirdiği gözlemişlerdir. PBO ve Menadione'nin ön uygulamasının dişilerde yapısal kromozom anormallikleri ve anormal hücrelerin yüzdesini artırdığını gözlemlemişlerdir.

Yardımcı vd. (2014) çalışmalarında erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçanlarının karaciğer ve böbreklerinde imidacloprid'in olumsuz etkisini PBO ve menadion ile modüle edilen imidacloprid'in cinsiyet, doku ve maruz kalma süresine bağlı etkilerini, oksidatif ve nörotoksik potansiyel etkilerini araştırma sonucunda İmidacloprid'in proksidasyon ve nörotoksik potansiyelindeki gözlenen farklılıkların cinsiyetler arasındaki metabolizmasındaki farklılıklar ile ilişkili olabileceğini belirtmişler ve PBO ile menadionun birlikte maruz kalmaları imidacloprid toksisitesini şiddetlendirdiğini bulmuşlardır. Tisch vd. (2007) yaptıkları çalışmada 85 hastadan aldıkları bademcik örneklerinde insan tonsil dokusundaki mukoza epitel hücrelerinde günümüzde kullanılan insektisitlerden PBO, KOMET test yöntemi ile genotoksik etkilerinin olup olmadığını araştırdıkları çalışma sonucunda test edilen tüm maddelerin insan tonsil dokusundan alınan mukoza epitel hücreleri üzerinde güçlü bir genotoksik etkiye sahip olduğunu kanıtlamışlardır.

Suzuki ve Suzuki (1995) çalışmalarında PBO'nun insan hücreleri için mutajenik potansiyelini araştırmışlardır. İnsan embriyo türevli RSA hücre suşu hücrelerinde PBO'nun mutajenitesini, ouabain direncini belirleyerek, hipermitate olarak kabul edilen çift transforme edilmiş insan embriyonal fibroblastlarının bir hücre çizgisini araştırmışlardır. Bu çalışmada PBO'nun RSA hücrelerinde hem Oua R mutasyonlarını hem de K-ras kodon 12 geninde mutasyonlarını indüklediğini bulmuşlardır.

Giampreti vd. (2013) yaptıkları çalışma ile 19 aylık bir bayan hastada Tip I piretroidlerin sindirime bağlı olarak gelişen tonik klonik nöbetler ve koma durumunu araştırmışlardır. Hasta hızla kötüleşen irritabilite ve ağlama ile tonik klonik nöbet ve koma halinde başvurmuştur. Hasta geldiği zaman hayati belirtileri normal ve BP 110/70 mmHg, HR 110 atım / dk ve SpO₂ % 98 oda havası dahil değerler ölçmüşlerdir. Gerekli tedavi işlemleri yapılan hastanın 9 saat önce %7 PBO içeren bir insektisitten bilinmeyen bir miktarda aldığını belirlemişlerdir. Bu insektisit Tip I piretroid %5 Bifentrin ve %3 Esbiothrinden oluşan bir karışım olduğunu anlamışlardır. Sonuçta hastanın plazmasında Bifentrin ve PBO seviyeleri ile ilişkili şiddetli piretroid nörotoksitesi görmüşlerdir.

PBO'nun kanserojen olmadığı düşünülse de (Cardy vd. 1979; Maekawa vd. 1985) Takahashi vd. (1994, a, b) yakın zamanda PBO'nun hem farelerde hem de sıçanlarda kanserojen olduğu, Tanaka vd. (1994) teratojenisitesini ve hepatosellüler karsinom oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle PBO'nun mutajenik veya kanserojen bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan Tip I piretroid Tetramethrin ile pestisitlerde sinerjist etki sağlayan PBO'nun birlikte kombinasyonu ülkemizde ticari olarak kullanılan oranlar dikkate alınarak belirlenmiştir. *Drosophila* Smar test sistemi kullanılarak normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerin kanat preparatlarında genotoksikite etkilerinin değerlendirilmeleri sonucunda elde edilen verilere ulaşılmıştır. Normal

metabolik aktiviteye sahip bireylerde 25 ppm PBO + 3.125 ppm Tetramethrin dozunun tüm parametreler bakımından genotoksisteyi inhibe ettiği gözlenmiştir. 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin ve 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin dozunun tüm parametreler bakımından genotoksisteyi indüklediği ancak kontrol grubuna göre önemli bir fark gözlenmemiştir. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde ise kontrol grubuna göre 25 ppm PBO + 6.25 ppm Tetramethrin ve 25 ppm PBO + 12.50 ppm Tetramethrin tüm dozların parametreleri karşılaştırıldığında genotoksisteyi arttırdığı gözlenmesine rağmen istatistiki bir önem gözlenmemiştir. 25 ppm PBO + 3.125 ppm Tetramethrin dozunun büyük tek tip klon sayısında bir miktar artışa neden olduğu diğer parametrelerinde ise genotoksisteyi inhibe ettiği gözlenmiş ancak elde edilen veriler kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış ve azalma olarak bulunmamıştır.

Çalışmamızda PBO + Tetramethrin birlikte uygulamasından elde ettiğimiz veriler genotoksistenin inhibe edildiği yönünde olduğu ve genotoksisteyi indüklediği yönünde olan dozlarla kontrol grubu arasında bir fark görülmemiştir. Literatürde bizim sonuçlarımızla paralellik gösteren sonuçlara sahip çalışmaların olduğu görülmektedir.

Karışımların toksikolojisi ile ilgili maddelerin sayısı giderek artmakla birlikte, bu çalışmaların çoğu, nispeten yüksek ve genellikle toksik dozlarda kısa süreli çalışmalarda test edilen iki veya üç bileşik ile sınırlıdır (Groten vd. 1997). Ayrıca, PBO ve Tetramethrin diğer pestisitlerle (özellikle sentetik piretroidlerle) en çok kombine edilen bileşikler olmasına rağmen, PBO ve Tetramethrinin kombinasyon toksisite çalışmaları literatürde çok sınırlıdır.

Yavuz vd. (2015) yaptıkları çalışmalarında PBO, Tetramethrin, Cypermethrin, alfa Triomethrin, Deltamethrin ile bunları farklı kombinasyonlarda uygulamak suretiyle subakut oral toksisteyi 70 adet wistar cinsi ratlar üzerinde değerlendirmişlerdir. Her iki cinsin rastgele dağılımı ile 7 grup oluşturmuşlardır. Gruplara verilen insektisitlerin farklı kombinasyonları ise 1. grup: Cypermethrin + PBO, 2. grup: Alfa Cypermethrin + PBO, 3. grup: Deltamethrin + PBO, 4. Grup: Cypermethrin +PBO + Tetramethrin, 5. Grup: Alfa Cypermethrin + PBO + Tetramethrin, 6. grup: Deltamethrin +PBO + Tetramethrin olmak üzere 28 gün boyunca her gün düzenli bir şekilde uygulamışlardır. Çalışma süresi boyunca herhangi bir hayvanda ciddi bir klinik bulgu ve mortaliteye rastlamamışlardır. Ancak 1. ve 3. gruplarda yem tüketiminin azaldığını gözlemlemişlerdir. 1., 2. ve 4. gruplarda özellikle cypermethrin ve alfa cypermethrin verilen gruplarda kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve hemoglobin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda tüm gruplarda bulunan erkek bireylerinde karaciğer, böbrek fonksiyonları ve protein metabolizması ile ilgili biyokimyasal sorunların ortaya çıktığını göstermişlerdir. Tüm deney gruplarında en yaygın bulgular olarak karaciğerde sentribular dejenerasyonu tespit etmişlerdir. Yavuz vd. (2010) araştırmalarında bazı sentetik piretroidlerden olan insektisitlerin PBO ve Tetramethrinin farklı kombinasyonlarını 70 yetişkin winstar

ratlarını 6 deney ve bir kontrol grubuna ayırarak 14 gün düzenli uygulamaları sonucunda dermal toksisitesini değerlendirmişlerdir. Klinik gözlemler hergün düzenli bir şekilde yapılarak hematolojik ve biyokimyasal parametreler oluşturmuşlardır. 60 deney hayvanının 27'sinin ölmesi ile % 27'lik yüksek bir ölüm oranı gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda uygulanan insektisit kimyasallarının vücut ağırlığı ve yem tüketilmesinin azalmasına neden olurken organ ağırlığının artmasına hematolojik ve biyokimyasal değişikliklerde neden olduğunu göstermişlerdir.

Piner ve Uner (2014) çalışmalarında *Oreochromis niloticus* beyinde piretroid modülasyonu sitokrom P450 ile pestisit lambda-sihalotrinin ve Piperonil bütoksit'in nörotoksik etkilerini araştırmışlardır. Balıkları 96 saat ve 15 gün boyunca kimyasallara maruz bırakmışlardır. Elisa tekniği ile Hsp70 içeriği ve AChE enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlemişlerdir. PBO'nun varlığında lambda-sihalotrin, GST ve AChE aktivitesinde azalmaya ayrıca nörotoksik etkiye oksidatif stresi artırarak neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Lambda-sihalotrinin, PBO varlığında nörotoksik etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. PBO'nun lambda-sihalotrinin oksidatif stres potansiyelini ve apoptotik etkilerini arttırdığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan Tip I pretroid S-bioallethrin ile pestisitlerde sinerjistik etki sağlayan PBO'nun birlikte kombinasyonu *Drosophila* SMAR test sistemi kullanılarak normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerin kanat preparatlarında genotoksikite etkilerinin değerlendirilmeleri sonucunda elde edilen verilere göre; normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde çalışılan dozların birlikte uygulamanın dozlarının tüm parametreler bakımından genotoksikiteyi istatistiksel önemde olmasa da inhibe ettiği gözlenmiştir.

Gupta vd. (1999) çalışmalarında sıçanlarda tek veya tekrarlı olarak pestisitlere maruz kalmanın gelişmekte olan kan beyin bariyerinde fonksiyonel bütünlüğü üzerindeki etkisini ve maruziyetin geçmesi sonucundaki etkilerini 2 günlük sıçan yavrularına oral yolla uygulama ile çalışmışlardır. Çalışmaları bazı pestisitlere tek veya kombinasyonlar halinde maruz kalmaya karşı BBB gelişiminde savunmasız olduğunu göstermişlerdir. Beyin gelişiminde gözlenen kalıcı etkilerin maruziyet ortadan kalksada devam ettiğini ve yaşamın sonraki dönemlerinde nörolojik işlevlerde bozuklukları yaratabileceğini saptamışlardır. Diel vd. (1998) yaptıkları çalışmadaki amaçları atopik bireylerde ve atopik olmayan kontrol gruplarında insan kan lenfositleri ve bazofiller üzerinde sentetik piretroid S-biyoallethrin'in *in vitro* etkilerinin immünotoksitesini incelemektir. S-biyoallethrin, konsantrasyona bağlı olacak bir şekilde 72 saatlik bir kültür periyodundan sonra lenfosit proliferasyonunun inhibisyonuna neden olduğunu ayrıca bazofillerden salınan histamin miktarının azaldığını saptamışlardır.

Mitsumori vd. (1996) çalışmalarında % 3 PBO içeren bir diyet verilen sıçanlarda lenf düğümleri olarak en iyi bilinen lenfopoietik organlarda atrofik değişiklikleri incelemişlerdir. Lenfoid dokuların atrofisinin kemik iliğinde ve vücut ağırlığı artışının

önlendiğini gözlemişlerdir. Ellinger-Ziegelbauer vd. (2005) çalışmalarında 1-15 gün boyunca PBO dahil olmak üzere dört farklı genotoksik olmayan karsinojenlerin tekrarlanan tedavisi ile başlatılan sıçanların karaciğerinde Affymetrix mikrodizileri kullanılarak karakteristik gen ekspresyon profillerini rapor etmişlerdir. Sitokrom P450 enzimleri ve PBO ile glutasyon-transferaz, glutasyon redüktaz ve benzerleri gibi oksidatif strese bağlı genlerle ilgili çeşitli genlerin güçlü up-regülasyonunun, mikrozomal oksidasyonun bir yan ürünü olarak ROS üretiminin artmış olabileceğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri veriler ve mevcut bulgular ile PBO verilen farelerin karaciğerinde büyük miktarda ROS üretilebileceğini göstermektedirler.

Yapılan literatür çalışmasında görüldüğü gibi sentetik piretroidlerinin kullanım alanlarının her geçen gün artması sonucunda, yapılan çalışmalardan bu maruziyet neticesinde piretroidlerin sadece insektisidal etkisinin olmadığı aynı zamanda oksidatif stres ve buna bağlı olarak genotoksik ve sitotoksik etkiler olmak üzere birçok yönden bazı olumsuz etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Özellikle mücadele edilen canlının direnç kazanması sonucunda piretroidlerin insektisidal etkisini artırmak için diğer piretroid veya insektisit türevleri ve bu kimyasalların etkisini artırmak için sinerjist maddeler kullanılarak yeni formülasyonlar elde edilmektedir. Oluşturulan yeni formülasyonların belirli bir orana göre yapılmaması ve literatürde yeterli düzeyde çalışmanın olmaması halk ve çevre sağlığı açısından meydana gelebilecek potansiyel riskler göz önüne alındığında endişe verici bir durum oluşturabilmektedir.

6. SONUÇLAR

Günümüzde halen açlıkla savaşılan ülkelerin bulunduğu bir Dünya’da yeterince besin maddesi elde edebilmek çok büyük bir önem kazanmaktadır. Artan Dünya nüfusu besinsel ihtiyacın artışına neden olsa da barınma ihtiyacının karşılanabilmesi için yeni yerleşim alanlarının açılması nedeniyle tarım alanları da giderek azalmaktadır. Diğer taraftan değişen iklim koşulları da dikkate alındığında birim alandan elde edilecek ürün hasadının en yüksek seviyeye çıkarmak gerekmektedir. Bu bağlamda pestisitlerin yoğun bir şekilde kullanılması kaçınılmazdır ve her geçen yıl pestisit kullanımı katlanarak artmaktadır. Tarım ilaçları büyük miktarlarda verimi arttırmak için ve aynı zamanda çevre düzenleme ve ev kullanımı için kentsel alanlarda uygulanmaktadır. Pestisit kullanılmadığı takdirde bitkilerde zararlılar nedeniyle oluşan hastalık ürün verimini yarı yarıya düşürmeye neden olmaktadır. Bu durum ülkelerin bireylerini hem sağlık hemde ekonomik yönden etkilemektedir.

Pestisitler arasında, geniş çaplı kimyasal ve fonksiyonel sınıflara dağıtılan yüzlerce çeşitlilikte kimyasal madde bulunmaktadır. Bunlar, bitki koruma ürünleri olarak tarımda yaygın olarak kullanılır ayrıca vektörle bulaşan hastalıkların önlenmesinin kontrolü için halk sağlığında kullanılmaktadır. Bu kimyasalların Dünya çapında kullanımı, insanların farklı kimyasal maddelere, genellikle düşük konsantrasyonlarda, tek pestisitlere veya çeşitli pestisitlerin kombinasyonuna sürekli olarak maruz kalmaları neticesinde insanlarda benzer etkilere yol açabileceği bilinmektedir. Böylelikle, düşük dozda pestisit karışımlarına uzun süre maruz kalmak, canlı vücudunda farklı pestisitler arasında çoklu potansiyel etkileşimlerin oluşabileceğinin düşünülmesi ve buna göre değerlendirilmesi gerekmektedir. Pestisitler zararlıları öldürmek için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bu kimyasallar sadece zararlıları değil, aynı zamanda hedef olmayan birçok canlıyı da tehdit etmektedir.

Pestisitlerdeki çeşitli kimyasallara maruziyet sağlık üzerinde zararlı etkilere neden olmakla birlikte çevreye verilen toksik etkiler açısından da ekosistemde etkileri büyüktür. Kullanımının kaçınılmaz olması düşünüldüğünde pestisitlerin sağladığı yararların yanında olumsuz etkilerinin minimum seviyede olacak şekilde uygulanması ancak ilgili kurumların önerdiği kimyasallar ve dozları ile bunları alanında uzman kişilerin veya bu konuda bilinçli kişilerin uygulamasının daha az hasara neden olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

Piretroidlerin kullanımının arttırılması sonucunda hedef olmayan canlılarda genotoksisiteye sebep oluşturabileceği düşünüldüğünde büyük bir endişe kaynağına neden olmaktadır. Çünkü genetik materyalde meydana gelen hasarın yeni nesillerde devam ederek geri dönüşümü olmayan kalıtsal bilgi aktarımına neden olduğu bilinmektedir. Bu endişeleri kontrol altına alabilmek için doğru piretroidleri doğru oranlarda kullanarak en etkili formülasyonları oluşturmak suretiyle hedef canlı için en

etkili dozu aynı zamanda hedef dışı canlılar içinde oluşabilecek zararlı etkileri an az seviyeye indirebilmek oldukça önemlidir.

Piretroidler toksik etki gösteren kimyasallar olduğu için tek başlarına kullanımları genelde uygun değildir. Bu nedenle uygun dozlarda piretroidlerin tek başlarına etkili olabildikleri gibi etkilerini artırabilmek için diğer piretroidler ve sinerjist etki sağlayan katkı maddeleri ile birlikte daha güçlü etkiye sahip insektisidal kimyasalları oluşturabilmek için formülasyonlar halinde kullanılmaktadırlar. Oluşturulan formülasyonlarda etken olan kimyasal madde, dolgu maddeleri ve kimyasalın etkisini artırarak daha az kimyasal kullanımını sağlayan sinerjist madde gibi çeşitli kimyasallar farklı oranlarda kullanılmaktadır. Günümüzde etkili insektisidal maddelerin oluşturulmasını sağlamak adına çok farklı formülasyonlar kullanılmakta ancak bu formülasyonlarda kullanılan bileşikler her hangi bir standarda göre hazırlanmamaktadır. Bu bağlamda her bir formülasyon diğer bir formülasyona göre içerdikleri bileşik oranları bakımından farklılık göstermektedir. Belirli bir oran olmadan düzensiz bir oranlamaya göre hazırlanan formülasyonlarda bulunan bileşiklerin etkileride farklı olacaktır. Doğru etkiyi sağlayan oranların elde edilmesi ile piretroidlere maruz kalan birçok hedef dışı organizma ve çevre korunmuş olacaktır.

Bu çalışmamız sayesinde elde ettiğimiz değerler sonucunda sentetik piretroidlerden oluşan insektisit formülasyonu hazırlanırken içerdği Tetramethrin, S-bioallethrin ve PBO'nun hangi oranlarda kullanılması gerektiğine dair bir katkı sağlanmaktadır. Her geçen gün artan pestisit kullanım miktarı göz önüne alındığında kullanılan kimyasal madde miktarının hızlı bir şekilde katlanarak arttığı görülmektedir. Kimyasal ürünlerin gereğinden fazla kullanımının ekonomik yük olarak getirdiği maddi yükümlülük dikkate alındığında belirlenen oranlarda kullanımının ülkelerin ekonomisinde katkı sağlayacağı bilinmelidir.

Piretroidler hava, su ve toprak olmak üzere her yerde bulunabilmekte ve canlılar cilde temas, solunum ve beslenme yolunun herhangi biri veya birkaçı ile pestisitleri bünyelerine almaktadırlar. Vücuda alınan kimyasalların bir kısmı vücut tarafından bertaraf edilerek dışarı atılabiliyorken bazı pestisitler vücutta bazı dokularda birikebilmektedir. Zamanla birikim sonucu insanlarda Kanser, Alzheimer, Parkinson, İmmün sistem, dolaşım ve boşaltım sistemleri sorunlarına neden olmaya devam etmekte ayrıca en önemli bulgulardan biride genetik materyal üzerinde etkili olarak kalıtsal hasarlara neden olabilmesidir (Meenakshi vd. 2012; Kim vd. 2017).

Bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in insanlarla genetik yapısının büyük oranda benzer olması ve ökaryotik bir canlı olması çalışmalardan elde edilen sonuçlar açısından büyük bir öneme sahiptir. *D.melanogaster*'e uygulanan kimyasalın organizmanın bütünlüğü içinde yapıyor olması ve organizmanın verdiği tepkinin *in vivo* test yöntemi ile değerlendirmesi çalışmanın önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan piretroidlerde bulunan kimyasalların etkilerinin genotoksik özelliği ortaya çıkarılmaya çalışıldı. Elde edilen veriler özellikle ülkemizde böcek mücadelesinde yaygın olarak kullanılan kimyasalların ticari olarak satılan formülasyonlardaki oranların genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi adına önem taşımaktadır.

Bu çalışmamızda elde edilen sonuçların ökoryatik bir canlıda *in vivo* olarak elde edildiği düşünüldüğünde insan sağlığına ve diğer canlılara sağlayacağı katkının önemi artmaktadır. Çalışmamız genotoksikoloji çalışmaları için bir ön adımı teşkil etmektedir. Bu kimyasalların farklı etkilerinin belirlenmesi için başka çalışmaların yapılması ile daha kesin sonuçlara ulaşabilmesi, farklı model organizmalarda *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleri kullanılarak desteklenmesi gerekmektedir.



- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S. and Rezaie, A. 2004c. Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor*, 10 (6), 141–147.
- Aguila, J. R., Hoshizaki, D. K. and Gibbs, A. G. 2013. Contribution of larval nutrition to adult reproduction in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 399-406.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2 (1), 1–12.
- Alaraby, M., Annangi, B., Marcos, R. and Hernandez, A. 2016. *Drosophila melanogaster* as a suitable *in vivo* model to determine potential side effects of nanomaterials: A Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. Critical Reviews*, 19 (2):65-104.
- Alkan Üstün, F. and Anlaş, C. 2015. Genotoxicity Tests and Genotoxic Poisons. Farmakoloji ve Toksikoloji AD, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, İstanbul Türkiye Klinikleri J Vet Sci. *Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 1(1):69-74.
- Amaral, A.F.S. 2014. Pesticides and Asthma: Challenges for Epidemiology Front Public Health. 2 p. 6.
- Ames, B.N., Durston, B.I.Z., Yamasaki, E., Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci., U S A.* 70(8): 2281–2285.
- Ames, B.N. 1989. Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. *Environmental and Molecular, Mutagenesis*, 14, 66-77.
- Anadón, A., Martínez – Larrañaga, M.R. and Martínez, M.A. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182: 7–20.
- Anonim 1: https://diptera.info/forum/viewthread.php?thread_id=42607. [Son erişim tarihi: 10.12.2018].
- Anderson, S.E. and Meade, B.J. 2014. Potential health effects associated with dermal exposure to occupational chemicals. *Environ Health Insights*, 8; 51–62.
- Arslan, S. 2016. Türkiye’de pestisit kullanımı ve çevresel etkiler. XII.Tarım Ekonomisi kongresi. Tarımsal Ekonomi ve Politika geliştirme Enstitüsü, Ankara.
- Arslan, M., Sevgiler, Y., Büyükleyla, M., Yardımcı, M., Yılmaz, M. and Rencuzoğulları, E. 2016. Sex-related effects of imidacloprid modulated by

- Piperonyl butoxide and menadione in rats. Part II: genotoxic and cytotoxic potential. *Drug Chem Toxicology*, 39(1): 81–86.
- Asghar, U., Malik, M.F. and Javed, A. 2016. Pesticide Exposure and Human Health: A Review. *Journal of Ecosystem and Ecograph*, S5.
- Ashwood-Smith, M.J., Trevino, J. and Ring, R . 1972. Mutagenicity of dichlorvos. *Nature*, 240: 418-420.
- Atreya, K., Sitaula, B.K., Overgaard, H., Bajracharya, R.M. and Sharma, S. 2012. Knowledge, attitude, and practices of pesticide use and acetylcholinesterase depression among farm workers in Nepal. *International Journal of Environmental Health, Research*, 22(5): 401–415.
- Atsdr, 2001. A Toxicological Profile for pyrethrins and pyrethroids. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Atsdr, 2003. U.S. Centers for Disease Control Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Auerbach, C. and Robson, J.M. 1942. Experiments on the action of mustard gas in *Drosophila*. Production of sterility and mutation. *Report to Ministry of Supply*. W. 3979.
- Aznar-Alemany, O., Giménez, J., Stephanis, R., Eljarrat, E., Barceló, D. 2017. Insecticide pyrethroids in liver of striped dolphin from the Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 225:346-353.
- Badarinath, J.C. 2006. Toxicology Department, Advinus Therapeutics Private Limited, Endura Study No. 4416/05.
- Bajpayee, M., Kumar, A. and Dhawan, A. 2013. The comet assay: assessment of in vitro and in vivo DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 1044: 325-45.
- Barr, D.B., Barr, J.R., Driskell, W.J., Hill, R.J., Ashley, D.L., Needham, L.L., Kafa, S.L. and Sampson, E.J. 1999. Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicology and Industrial Health*, 15(1-2):168–179.
- Beamand, J.A., Price, R.J., Phillips, J.C., Butler, W.H., Jones, G.D., Osimitz, T.G., Gabriel, K. L., Preiss, F. J. and Lake, B. G. 1996. Lack of effect of piperonyl butoxide on unscheduled DNA synthesis in precision-cut human liver slices. *Mutation Research*, 371(3-4):273-282.

- Bender, M.A., Griggs, H.G., Bedford, J.S. 1974. Mechanisms of chromosomal aberration production.III. Chemicals and ionising radiation. *Mutation Research*, 23:197–212.
- Bille, L., Giovanni, B. and Claudio, G. 2017. The first report of the fish-killing event caused by pyrethroids in Italian sweet waters. *Adli Bilim Uluslararası*, H. 281:S.176- 182.
- Bolognesi, C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543:251–272.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P. and Marcos, R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26: 19–26.
- Bonetta, L. 2002. Pesticide-Parkinson link explored. *Nature Medicine*, 8(10): 1050.
- Bradberry, S.M., Cage, S.A., Proudfoot, A.T. and Allister Vale, J. 2005. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2): 93–106.
- Brusick, D. 1980. Chapter 2—Fundamentals of Genetic Toxicology.In: Principles of Genetic Toxicology. Plenum Pres. New York. pp. 11–44.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A.R. and Battershill, J.M. 2006. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. *Mutagenesis*, 21 (2):93–103.
- Burgat, V. et al; 1992. Piperonyl butoxide - National Library of Medicine HSDB Database. *Toxicol Lett* (Suppl 1-356): 306.
- Butler, W.H., Gabriel, K.L., Preiss, F.J. and Osimitz, T.G. 1996. Lack of genotoxicity of piperonyl butoxide. *Mutation Research*, 371: 249-258.
- Cardy, R.H., Renne, R.A., Warner J.W. and Cypher, R.L. 1979. Carcinogenesis bioassay of technical-grade piperonyl butoxide in F 344 rats, *Journal of the National Cancer Institute*, 62: 569-576.
- Casida, J.E. 1998. Edited by Denys Glynne Jones. Piperonyl Butoxide The Insecticide Synergist.S-430.
- Chaudhari, R. and Saxena, K.K. 2016. Genotoxicological Assessment Of Pyrethroid Insecticide Bioallethrin In Freshwater Fish Channa Punctatus. *Research Journal of life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2(4): 56.
- Castellanos, A., Andres, A., Bernal, L., Callejo, G., Comes, N., Gual, A., Giblin, J.P., Roza, C. and Gasull, X. 2018. Pyrethroids inhibit K: basis of insecticide-induced paraesthesias 2P: basis of insecticide-induced paraesthesias

- channels and activate sensory neurons: basis of insecticide-induced paraesthesias. *PAIN*, 159(1): 92–105.
- Chen, T., Tan, J., Wan, Z., Zou, Y., Afewerky, H. K., Zhang, Z. and Zhang, T. 2017. Effects of Commonly Used Pesticides in China on the Mitochondria and Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12): 2507.
- Chrousos, G. P., Charmandari, E. and Kino, T. 2004. Glucocorticoid action Networks an introduction to systems biology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89: 563–564.
- Chyb, S. and Gombel, N. 2013. Atlas Drosophila Morphology, wild-type and classical mutants. *Elsevier Inc*, China.
- Clark, J., Schrader, W. and O'Malley, B. 1992. Mechanism of steroid hormones. In: Wilson, J., Foster, D. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*. WBSanders Co., Philadelphia. pp. 35–90.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S. and Soto, A.M. 1993. Developmental effects of endocrinedisrupting chemicals inwildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101:378–384.
- Costa, L. G. 1988. Organophosphorus compounds. In: Recent advances in nervous system toxicology. Eds: C.L. Galli, L. Manzo, P.S. Spencer. *Plenum Publishing Corporation*, New York, 203-246.
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M. and Vitalone, A. 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers. Bioscience*, 13: 1240-1249.
- Couteur, D. G., Mclean, A.J., Taylor, M. C., Woodham, B.L. and Board, P.G. 1999. Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacol*, 53: 122-30.
- Çakır, Ş. ve Yamanel, Ş. 2005. Böceklerde İnsektisitlere Direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6(1): 21-29.
- Çaylak E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stress ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1):73-83.
- Çetin, H., Çilek, J.E., Öz, E., Aydın, L., Deveci, Ö. and Yanıkoğlu, A. 2009. Comparative efficacy of spinosad with conventional acaricides against hard and soft tick populations from Antalya, Turkey. *Veterinary Parasitology*, 163 : 101–104.

- Damalas, C.A. and Eleftherohorinos, G.E. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 (5): 1402–1419.
- Das, Y.K. ve Aksoy, A. 2016. Pestisitler. Türkiye Klinikleri. *Journal Veterinary Sciences Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 2(2):1-17.
- Debost-Legrand, A., Warembourg, C., Massart, C., Chevrier, C., Bonvallot, N., Monfort, C., Rouget, F., Bonnet, F. and Cordie, R.S. 2016. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environmental Research*, 146: 207–217.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. “Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları” Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre.
- Demir, E., Kaya, B., Kocaoğlu Cenkci, S., Çetin, H. and Marcos, R. 2014. *In vivo* Genotoxicity of Four Synthetic Pyrethroids with Combinations of Piperonyl Butoxide (PBO) Using the Drosophila SMART Assay. *Ekoloji*, 23, 92: 9-18.
- Demirel, S. and Zamani, A. 2002. “Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları”. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-27.
- Diel, F., Detscher, M., Schock, B. and Ennis, M. 1998. In vitro effects of the pyrethroid S-bioallethrin on lymphocytes and basophils from atopic and nonatopic subjects. *Allergy*, 53: 1052-1059.
- DPT. 2008. “Gübre ve Tarım ilaçları” Devlet Planlama Teşkilatı, “9. Beş Yıllık Kalkınma Planı Kimya Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu, DPT, Ankara.
- Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S. and Wang, X. 2010. Assessing Hormone Receptor Activities of Pyrethroid Insecticides and Their Metabolites in Reporter Gene Assays. *Toxicological Sciences*, 116(1): 58–66.
- Ecobichon, D.J. 2001. Carbamate insecticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology. Ed: R. Krieger. Academic Press, San Diego, 1087-1106.
- Ecobichon, D.J., 1996. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. (Eds.), Casarett & Doull’s Toxicology: The Basic Science of Poisons.

- Edwards R., Millburn De UKP. and Hutson, D.H. 1987. The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis-and trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal Xenobiotica*, 17:10.
- El-Akkad, D.M.H., El-Gebaly, N.S.M., Yousof, H.A.S.A. and İsmail, M. A. M. 2016. Electron microscopic alterations in pediculus humanus capitis exposed to some pediculicidal plant extracts. *Korean Journal of Parasitology*, 54 (4): 527-532.
- El-Demerdash, F.M. 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6): 1346–1352.
- Ellinger, H., Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W. and Juergen Ahr, H. 2005. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutation Research*, 575: 61–84.
- Elliott, M. 1995. Chemicals in insect control. In: Casida JE, Quistad GB, editors. *Pyrethrum Flowers: production, chemistry, toxicology, and uses*. New York: Oxford University Press; pp. 3–31.
- Environmental Protection Agency: (U.S. EPA), 2011. Pyrethroid Cumulative Risk Assessment. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html#epa>.
- Eriksson, P. and Fredriksson, A. 1991. Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15; 108 (1):78-85.
- Evangelou, E., Ntritsos, G., Chondrogiorgi, M., Kavvoura, F.K., Hernandez, A.F., Ntzani, E.E. and Tzoulaki, I. 2016. Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Environment International*, 91:60–68.
- Evans, H.J. 1984. “Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”, In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 405–427.
- Everett, C. J. and Matheson, E. M. 2010. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 national health and nutrition examination survey *Environment International*, 36(4):398-401.

- Fang, F., Bernigaud, C., Candy, K., Melloul, A. İ. and Duran, R. 2015. Efficacy assessment of biocides or repellents for the control of *Sarcoptes scabiei* in the environment. *Parasites & Vectors*, 8:416.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K.L.1995. "The comet assay: a comprehensive review", *Mutation Research*, 339: 37-59.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Retrieved on 2007-10-25.
- FAO/WHO. 2011. Fao Specifications And Evaluations For Agricultural Pesticides. Fao Specifications and Evaluations For Piperonyl Butoxide. Page 1 – 27.
- FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://faostat3.fao.org/search/pyrethroid/E>).
- Feo, M.L., Eljarrat, E. and Barcelo, D. 2010. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 692–705.
- Frei, H. and Wurgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- Freire, C. and Koifman, S. 2012. Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiologica evidence of association. *Neurotoxicology*, 33(5):947-971.
- Frölich, A. and Würgler, F.E. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutation Research*, 216(3): 179-187.
- Fujitani, T., Tanaka, T., Hashimoto, Y. and Yoneyama, M., 1993. Subacute toxicity of piperonyl butoxide in ICR mice. *Toxicology*, 83: 93–100.
- Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M., O'Shea, J.J., Boettner, G.P. and Bornstein, S.R. 2002. Gene profiling reveals unknownenhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB Journal*, 16: 61–71.
- Garcia, F.P., Ascencio, S.Y.C., Oyarzun, J.C.G., Hernandez, A.C. and Patricia Vazquez Alavarado, P.V. 2012. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicolog*, 1 (11): 279–293.

- George, J. and Shukla, Y. 2011. Review Pesticides and cancer: Insights into toxicoproteomic-based findings. Sciverse Science Direct. *Journal of Proteomics*, 74: 2713-2722.
- Giampreti, A., Lampati, L., Chidini, G., Rocchi, L., Rolandi, L., Lonati, D., Petrolini, V.M., Vecchio, S., Locatelli, C.A. and Manzo, L. 2013. Recurrent tonic-clonic seizures and coma due to ingestion of Type I pyrethroids in a 19-month-old Patient. *Clinical Toxicology*, 51: 497-500.
- Gilden, R.C., Huffling, K. and Sattler, B. 2010. Pesticides and health risks. J. Obstet. Gynecol. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 39 (1): 103-110.
- Ginsburg, K. and Narahashi, T. 1999. Time course and temperature dependence of allethrin modulation of sodium channels in rat dorsal root ganglion cells. *Brain Research*, 13; 847(1): 38-49.
- Go, V., Garey, J., Wolff, M.S. and Beatriz, G. T. 2011. Estrogenic Potential of Certain Pyrethroid Compounds in the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line. Pogo3. *Environmental Health Perspectives*, 107: 3.
- Godin, S.J., Devito, M.J., Hughes, M.F., Ross, D.G., Scollon, E.J., Starr, J.M., Setzer, R.W., Conolly, R.B. and Tornero-Velez, R. 2010. Physiologically based pharmacokinetic modeling of deltamethrin: development of a rat and human diffusion-limited model. *Toxicological Sciences*, 115:330-343.
- Goldenthal, E.I. 1993a. Evaluation of piperonyl butoxide in an eight week toxicity study in dogs. Unpublished report No. 542-004 from International Research and Development Corp., Mattawan, Michigan, USA. Submitted to WHO by Endura SA, Bologna, Italy, for the Piperonyl Butoxide Task Force, Washington DC, USA. 59-67.
- Gong, D.C. 2013. Pyrethroids Pesticides Residues and Their Behavior in a Multimedia Environment of Liangtan River Basin (Master thesis). Chongqing Univer, Chongqing.
- Graf, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51: 168-173.
- Graf, U. and Schaik, N.V. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 271: 59-67.

- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J. and Wurgler, F.E. 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 222: 359-373.
- Graf, U., Van Schaik, N., and Wurgler, F.E. 1992. *Drosophila* Genetics "apratical course" spinger-Verlang Berlin Heidelberg.
- Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juan, H., Hall, C. B. and Kale, P. G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6: 153-188.
- Groten, J.P., Schoen, E.D., Van Bladeren, P.J., Kuper, C.F., Van Zorge, J.A. and Feron, V.J. 1997. Subacute toxicity of a mixture of nine chemicals in rats: detecting interactive effects with a fractionated two-level factorial design. *Fundamental and Applied Toxicology*, 36(1): 15–29.
- GTHB, 2015. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı ve Karantina Daire Başkanlığı.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., Konradsen, F. 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*, 7: 357–371.
- Gupta, G., Chaitanya, R. K., Golla, M. and Karnati, R. 2013. Allethrin toxicity on human corneal epithelial cells involves mitochondrial pathway mediated apoptosis. *Toxicology in Vitro*, 27: 2242–2248.
- Gupta, A., Nigam, D., Gupta, A., Shukla, G.S. and Agarwal, A.K. 1999. Effect of pyrethroid-based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats. *Journal of Applied Toxicology*, 19(1): 67-72.
- Guy, R.C. 2005. Toxicity testing, mutagenicity. In: Wexler, P., Anderson, B.D., Peyster, A.D., (Eds.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier Inc.
- Guzelian, P. S. 1982. Comparative toxicology of chlordecone (Kepone) in humans and experimental animals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 22: 89-113.
- Guzman-Rincon, J., Ramirez-Victoria, P. and Benitez L. 2001. In: F.M: Butterworth, A. Gunatilaka and M.E. Gonshebb, Biomotors and Biomarkers as Indicators of Enviromental change2, A Handbook, Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp. 221-237, New York.
- Güler, Ç ve Çobanoğlu, Z. 1997. Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52.pp:17-21.

- Hara, S., Suzuki, T., and Miyamoto, J. 1980b. Skin sensitization test of Neopynamin Forte, technical in guinea-pigs (Technical Report No. IT-00-0082) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- Hällström, I. and Blanck, A. 1984. Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology*, 33(1): 13-20.
- He, F., Wang, S., Liu, L., Chen, S., Zhang, Z. and Sun, J. 1989. Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Archives of Toxicology*, 63: 54-58.
- Herrera, A. and Laborda, E. 1988. Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, 3(6):509-14.
- Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R. and López-Guarnido, O. 2013a. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology*, 307: 136–145.
- Hossain, M.M., Suzuki, T., Unno, T., Komori, S. and Kobayashi, H. 2008. Differential presynaptic actions of pyrethroid insecticides on glutamatergic and GABAergic neurons in the hippocampus. *Toxicology*, 14; 243(1-2):155-63.
- Hour, T.C., Chen, L. and Lin, J.K. 1998. Comparative investigation on the mutagenicities of organophosphate, phthalimide, pyrethroid and carbamate insecticides by the Ames and lactam tests. *Mutagenesis*, 13(2):157-66.
- Inchem, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc98.htm>. [Son erişim tarihi; 25.03.2018].
- International Agency For Research On Cancer (IARC) Workin Group. 1991. Occupational exposures in spraying and application of insecticides. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum. 53:45–92.
- Ishidate, JrM., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A. 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22(8): 623-636.
- Jakoby, W.B. and Ziegler, D.M. 1990. "The enzymes of detoxication". *Journal of Biological Chemistry*, 265 (34): 20715–8.
- Kadala, A., Charreton, M., Jakob, I., Le Conte, Y. and Collet, C. 2011. A usedependent sodium current modi Wcation induced by type I pyrethroid insecticides in honeybee antennal olfactory neurons. *Neurotoxicology*, 32: 320–330.

- Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9: 527-549.
- Kawachi, T., Yahagi, T., Kada, T., Ishidate, M. Sasaki, M. and Sugiyama, T. 1980. Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan, *IARC Scientific Publications*, 27: 323–330.
- Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K. 2009. Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice. *Toxicologic Pathology*, 37(6): 761-9.
- Kaya, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 134 ss., Antalya.
- Kaya, B., Yanıkoğlu, A., Creus, A. and Marcos, R. 2000a. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 465: 77-84.
- Kaya, B., Creus A., Velázquez, A. and Marcos, R. 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research*, 520: 93–101.
- Kim, K. H., Kabir, E. and Jahan, S.A. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575 - 525–535.
- Kim, K-B., Anand, S.S., Kim, H.J., White, C.A. and Bruckner, J.V. 2008. Toxicokinetics and tissue distribution of Deltamethrin in Adult Sprague Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, 101:197–205.
- Kim, S.S., Kwack, S.J., Lee, R.D., Lim, K.J., Rhee, G.S., Seok, J.H., Kim, B.H., Won, Y.H., Lee, G.S., Jeung, E.B., Lee, B.M. and Park, K.L. 2005. Assessment of estrogenic and androgenic activities of tetramethrin *in vitro* and *in vivo* assays. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 10; 68(23-24): 2277-89.
- Kim, I.Y., Shin, J.H., Kim, H.S., Lee, S.J., Kang, I.H., Kim, T.S., Moon, H.J., Choi, K.S., Moon, A. and Han, S.Y. 2004. Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using *in vitro* combination assays. *The Journal of Reproduction and Development*, 50(2):245-55.
- Klopčič, I., Kolšek, K. and Dolenc, M.S. 2015. Glucocorticoid-like activity of propylparaben, butylparaben, diethylhexyl phthalate and tetramethrin mixtures studied in the MDA-kb2 cell line. *Toxicology Letters*, 232: 376–383.

- Klug, W.S. and Campbell, D. 1973. External Morphology Of The Egg Of *Drosophila Melanogaster* Meigen (Diptera: *Drosophilidae*). 1111. J.III.«CI Murph, &Embryo, 3 (I): 33-40.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. 2006. Genetik kavramlar. 8. Baskı. 14. Bölüm. S-354.
- Kocaoğlu Cenkci, Serap. 2010. İki Heterosiklik Amin'in Genotoksisitesine Karşı Klorofil A ve Klorofil B'nin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon Ve Rekombinasyon Testi İle Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 84 ss., Antalya.
- Kolsek, K., Gobec, M., Rascan, I.M. and Dolenc, M.S. 2014a. Molecular docking revealed potential disruptors of glucocorticoid receptor-dependent reporter geneexpression. *Toxicology Letters*, 226: 132–139.
- Koolhaas, J., Korte, S., De Boer, S., Van Der Vegt, B., Van Reenen, C., Hopster, H., DeJong, I., Ruis, M. and Blokhuis, H. 1999. Coping styles in animals: current status inbehavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23: 925–935.
- Kontaş, S., Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu,V. 2011. Kardeş Kromatid Değişimi Testi ve Kullanım Alanları. *TÜBAV Bilim* 4, 226-234.
- Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A. and Hadjichristodoulou, C. 2012. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes.*Toxicology Letters*, 210 (2): 155e168.
- Kubilay, B. 2013. Karbamatlı pestisitlerden carbaryl'in Tatlı su istakozlarında (*astacus leptodactylus* esch. 1823) Akut toksik etkisinin belirlenmesi.Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 71s.
- Kutluyer F. ve Aksakal E. 2013. Sucul Model Organizmalar ve Biyoteknolojide Kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(2):101-107.
- Srivastava, A.K., Srivastava, P.K., Al-Khedhairyc, A.A., Musarratc, J. and Shuklaa, Y. 2012. Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutation Research*, 747: 22– 28.
- Lake, B.G.1995. An Investigation of the Effect of Piperonyl Butoxide on Unscheduled DNA Synthesis in Cultured Human Liver Slices. Unpublished report No. 1501/1 from BIBRA International, Carshalton, Surrey, United Kingdom. Submitted to WHO by Endura SA, Bologna, Italy, for the Piperonyl Butoxide Task Force, Washington DC, USA.

- Lawlor, T.E. 1991. Piperonyl Butoxide in the Salmonella/mammalian-microsome Reverse Mutation Assay (Ames Test) with a Confirmatory Assay. Unpublished report No. 14413-0-401R from Hazleton Washington, Kensington, Maryland, USA. Submitted to WHO by Endura SA, Bologna, Italy, for the Piperonyl Butoxide Task Force, Washington DC, USA.
- Lawrence, L. J. and Casida, J. E. 1983. Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science*, 221: 1399-1401.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego, CA: Academic Press.
- Li, H., Cheng, F., We Y., Lydy, M.J. and You, J. 2017. Review Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview *Journal of Hazardous Materials*, 324 : 258–271.
- Liang, L., Yue, F. and Li, H. 2005. Experimental research on subchronic oral toxicities and mutagenicities of S-bioallethrin. *Chinese Occupational Medicine*, en.cnki.com.cn.
- Lisa, C., Arnaud, B. and Marc, W. L. 2017. Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. *Plos One*, 12 : 1: e 0169480.
- Liu, Y., Liang, L.Y., Ma, W.L. and Zheng, W.L. 2006. Effect of S-bioallethrin on human lymphocyte. Article in Chinese. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(3): 321-4, 327.
- Loomis, T.A. 1978. Essentials of Toxicology, 3rd edition, Philadelphia, Lea and Febiger, pp.157-232.
- Lotti, M. 2000. Organophosphorus compounds. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds: P.S. Spencer, H.H. Schaumburg and A.C. Ludolph. *Oxford University Press*, Oxford, 898-925.
- Ma, X. 2009. Research progress on analytical technique of pyrethroid pesticide malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex linked recessive lethal tests. *Mutation Research*, 113: 117-133.
- McCavera, S. J. and Soderland, M. D. 2012. Differential state-dependent modification of inactivation-deficient Nav1.6 sodium channels by the pyrethroid insecticides S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin. *Neurotoxicology*. 33(3): 384-390.

- Madhubabu, G. and Suresh, Y. 2014. Allethrin induces oxidative stress, apoptosis and calcium release in rat testicular carcinoma cells (LC540). *Toxicology in Vitro*, 28: 1386–1395.
- Madhubabu, G. and Suresh Y. 2017. Allethrin toxicity causes reproductive dysfunction in male rats. *Environmental Toxicology*, 32: 1701–1710.
- Maekawa, A., H. Onodera, K. Furuta, H. Tanigawa, T. Ogiu and Y. Hayashi. 1985. Lack of evidence of carcinogenicity of technical-grade piperonyl butoxide in F 344 rats: selective induction of ileocaecal ulcers, *Food and Chemical Toxicology*, 23: 675-682.
- Marcos, R. and Carmona, E. R. 2013. The Wing-Spot and the Comet Tests as Useful Assays Detecting Genotoxicity in *Drosophila*. In: A.DHAWAN and M.Bajpayee (Editors), *Genotoxicity Assessment, Methods and Protocols, Methods IN Molecular Biology*, Springer Science, Business Media, pp.417-427.
- Markow, T.A. 2015. The Natural History Of Model Organisms. The secret lives of *Drosophila* flies. *e Life*. 4, doi: 10.7554/e06793.
- Matsumura, F. 2012. *Toxicology of insecticides*. Springer Science & Business Media.
- Matsuo, N. and Mori, T. 2012. Pyrethroids. From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 233s.
- Matthews, G.A. 2006. *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Mauck, W.L., Olson, L.E. and Marking, L.L. 1976. Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 4: 18-29.
- Meenakshi Sharon, P., Bhawana, M., Anita, S. and Gothecha, V.K. 2012. A short review on how pesticides affect human health. *International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine*, 5: 935–946.
- Mercan, U. 2007. Bioallethrinlerin sağlık üzerine olumsuz etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 18(2):73-78.
- Meyer, U.A. 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. 1996. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 24(5): 449–459.
- Miyamoto, J. 1976. Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ Health Perspect*, 14: 15-28.

- Mitsumori, K., Takegawa, K., Shimo, T., Onodera, H., Yasuhara, K., Takahashi, M. 1996. Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan. Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lympho-hematopoietic organs of rats treated with piperonyl butoxide or subjected to dietary restriction. *Arch Toxicol*, 70(12): 809-14.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211–268.
- Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K. and Shirasu, Y. 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Research*, 116(3–4): 185-216.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455 : 29–60.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2012a. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2 (3): 1000e1108.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2012b. The role of environmental pollution of pesticides in human diabetes. *International Journal of Pharmacology*, 8(2): 139-140.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. Invited Review Article. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268: 157-177.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M. 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*, 91:549–599.
- Motoyama, I., Yanagidaira, T., Sakai, A., Minakami, T. and Taguchi, H. 1975a. Esbiol. The results of subacute and chronic toxicity tests in the rat (6-month study), Shinshu, Japan, Shinshu University Medical College, 54 pp (Report No. SU-SB-75.07.19/A) (Unpublished proprietary data supplied by Roussel Uclaf).
- Muguruma, M., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Saegusa, Y., Yasuno, H., Jin, M., Matsumoto, S., Takabatake, M., Arai, K. and Mitsumori, K. 2009. Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol*, 83(2):183-93.
- Muguruma, M., Arai, K., Moto, M., Nishimura, J., Dewa, Y. and Mitsumori, K. 2008. Piperonyl butoxide activates c-Jun and ATF-2 in the hepatocytes of mice. *Arch Toxicol*, 82(10): 749-53.

- Murli H, 1992, Sumitomo Report No. IT21-0254.
- Müller, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*. 143:581–583.
- Mwkozlowski, 2012. https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=8794. [Son erişim tarihi: 24.05.2018].
- Narahashi T, Carter, D.B., Frey, J., Ginsburg, K., Hamilton, B.J., Nagata, K., Roy, M.L., Song, J.H. and Tatebayashi, H. 1995. Sodium channels and GABAA receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicology Letters*, 82-83: 239-245.
- Narahashi, T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology Toxicology*, 78: 1-14.
- Nolan, C.J., Damm, P. and Prentki, M. 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* (London, England) 378: 169–181.
- Ogata, A., Ando, H., Kubo, Y., Sasaki, M. and Suzuki, K. 1993. Teratogenicity of Teratogenicity of piperonyl butoxide in ICR mice .Abstracts of Papers Presented at the Thirty-Third Annual Meeting of the Japanese Teratology Society.
- Okamiya, H., Mitsumori, K., Onodera, H., Ito, S., Imazawa, T., Yasuhara, K., Takahashi, M., 1998. Mechanistic study on liver tumor promoting effects of piperonyl butoxide in rats. *Arch Toxicol*, 72: 744–750.
- Ong, C., Yung, L. L., Cai, Y., Bay, B. H. and Baeg, G.H. 2014. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3): 396–403.
- Osaba, L., Aguirre, A., Alonso, A. and Graf, U. 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 439: 49-61.
- Özdemir, F., Kayaaltı, Z. ve Kaya-Akyüzlü, D. 2015. Ksenobiyotiklerin DNA Üzerindeki Toksik Etkileri ve Toksikogenetik. Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Dikimevi, Ankara.
- Öztaş, E., Ulus, B. and Özhan, G. 2015. In Vitro Investigation on the Toxic Potentials of Commonly Used Synthetic Pyrethroids, Especially Esbiothrin. *Applied In Vitro Toxicology*, 1:4.
- Palanikumar, L. and Panneerselvam, N. 2011. Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. *Genetika*. 47(9):1169-74.

- Pandey, U.B. ve Nichols, C.D. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, 63:411–463. doi: 10.1124/pr.110.003293.
- Parker, C.M., Albert, J.R., VanGelder, G.A., Patterson, P.R. and Taylor, J.L. 1985. Neuropharmacologic and neuropathologic effect of fen valerate in mice and rats. *Fundamental and applied toxicology*, 5: 278-286.
- Parron, T., Requena, M., Hernandez, A. F. and Alarcon, R. 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3): 379-385.
- Pence, D.H., Wolfe, G.W., Kulwich, B.A., Hepner, K.E. and Snyder, F.G. 1986b. Two-Generation Reproduction Study In Rats. Neopynamin Forte, Final Report, Hazleton Laboratories, Inc. (Technical Report No. It-61-0201) (Submitted To Who By Sumitomo Chemical Co.).
- Phillips, J.C., Price, R.J., Cunninghame, M.E., Osimitz, T.G., Cockburn, A., Gabriel, K.L., Preiss, F.J., Butler, W.H., Lake, B.G. 1997. Effect of piperonyl butoxide on cell replication and xenobiotic metabolism in the livers of CD-1 mice and F344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38(1):64-74.
- Piperakis, S.M., Kontogianni, K., Siffel, C. and Piperakis, M.M. 2006. Measuring the Effects of Pesticides on Occupationally Exposed Humans with the Comet Assay. *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox.
- Piner, P. and Uner, N. 2014. Neurotoxic Effects of Lambda-cyhalothrin Modulated by Piperonyl Butoxide in the Brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology*, DOI 10.1002/tox.
- Prevec, J.S. Okoampah, N.D. and Morton, R.A. 1992. Organophosphorus insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. *Journal of Genetics*, 71(3): 121–134.
- Ray, D.E. and Fry, J.R. 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111: 174-193.
- Ray, D.E., Burr, S.A. and Lister, T. 2006. The effects of combined exposure to the pyrethroids deltamethrin and S-bioallethrin on hippocampal inhibition and skeletal muscle hyperexcitability in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216: 354–362.
- Ray, D. E. and Forshaw, P.J. 2000. Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38(2): 95-101.

- Roberts, D.B. 2006. *Drosophila melanogaster*: The Model Organizm. *Entomologia Experimentalis et applicata*, 121:93-103.
- Rushmore, T.H. and Tony Kong, A. 2002. Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes. *Current Drug Metabolism*, 3: 481-490.
- Rutter, H.A., Nelson, Jr., Kundzins, L.W. and Mchugh, W. 1974. Two-year dietary administration in the rat. Neopynamin Final Report, Vienna, Virginia, Hazleton Laboratories, Inc. (Technical Report No. IT- 41-0024) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- Saito, K., Tomigahara, Y., Ohe, N., Isobe, N., Nakatsuka, I., Kaneko, H.2000. Lack of significant estrogenic or antiestrogenic activity of pyrethroid insecticides in three in vitro assays based on classic estrogen receptor alpha-mediated mechanisms.*Toxicological Sciences*, 57(1):54-60.
- Saka, W.A., Akhigbe, R.E., Azeez, O.M., Babatunde, T.R., 2011. Effect of pyrethroid exposure on haematological and haemostatic profiles in rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 14: 1024–1027.
- Sakamoto, Y., Matsumoto, K. and Ogami, H. 1975a . Irritant effect of esbiol and allethrin on the eye mucosa of the rabbit, Osaka, Japan, Osaka University Medical School, 4 pp (Report No. OU-SB-75.03.22/A) (Unpublished proprietary data supplied by Roussel Uclaf).
- Salvatore, A.L., Bradman, A. and Castorina, R. 2008. Occupational behaviors and farmworkers' pesticide exposure: findings from a study in Monterey County, California. *The American Journal of Industrial Medicine*, 51: 782–794.
- Sato, T. and Narama, K. 1980b. Reproduction test of Neopynamin. Part 2: Teratology study in rats, Shizuoka, Hamamatsu Seigiken Research (Technical Report No. IT-01-0076) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- Sato, T. and Narama, K. 1980c. Reproduction test of Neopynamin. Part 3: Teratology study in rabbits, Shizuoka, Hamamatsu Seigiken Research (Technical Report No. IT-01-0077) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- Sato, H., Arai, M., Hagiwara, A. and Arai, M. 1985. Chronic toxicity and oncogenicity study of Pynamin Forte in rats, Nagoya, Japan, Daiyu-kai Institute of Medical Sciences (Technical Report No. KT-51-0058). (Proprietary data made available by Sumitomo Chemical Co., Ltd).

- Schleier, J. J. and Peterson, K. D. P. 2011. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. Chapter 3. Department of Land Resources and Environmental Sciences, Montana State University, 334 Leon Johnson Hall, Bozeman, MT 59717, USA.
- Schettgen, T., Heudorf, U., Drexler, H. and Angerer, J. 2002. Pyrethroid exposure of the general population is this due to diet. *Toxicology Letters*, 134: 141–145.
- Schuller, H.M. and McMahon, J.B. 1985. Inhibition of N-nitrosodiethylamine-induced respiratory tract carcinogenesis by piperonyl butoxide in hamsters. *Cancer Research*, 45(6):2807-12.
- Scollon, E.J., Starr, J.M., Godin, S.J., DeVito, M.J. and Hughes, M.F. 2009. *In Vitro* Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metabolism And Disposition* Vol. 37, No. 1. Dmd 37:221–228.
- Scott, J. 1991. Insecticide resistance in insects. In: *Handbook of Pest Management*, 1 2, pp 663–677.
- Sega, G.A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research, Reviews in Genetic Toxicology*, 134 : 2-3, 113-142.
- Selby, P.B. and Olson, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- Selim, S., Preiss, F.J., Gabriel, K.L., Jonkman, J.H., Osimitz, T.G. 1999. Absorption and mass balance of piperonyl butoxide following an 8-h dermal exposure in human volunteers. *Toxicol Letters*, 30;107(1-3):207-17.
- Selvi, M., Çavas, T., Karasu Benli, A.Ç., Koçak Memmi, B., Çinkılıç, N., Sepici Dinçel, A., Vatan, Ö., Yılmaz, D., Sarıkaya, R., Zorlu, T. and Erkoç, F. 2011. Sublethal Toxicity of Esbiothrin Relationship with Total Antioxidant Status and *In Vivo* Genotoxicity Assessment in Fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) Using the Micronucleus Test and Comet Assay. *Environmental Toxicology*.
- Sent, 1986. Ipcs international programme on chemical safety health and safety guide no. 31. Tetramethrin. Inchem.
- Shehata, A., Taha, M., İbrahim, T. and Seedek, A. 1991. Toxopathological effects of Ezalo-mat on male albino mice. *Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical pathology*, 4 (1): 187-198.

- Shinoda, N., Sugiyama, O. and Takagaki, Y. 1975. Esbiol teratological test results in rats and mice, Japan, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, 42 pp (Report No. P-SB-75.02.28.A) (Unpublished proprietary data supplied by Roussel Uclaf).
- Simeonov, L.I., Macaev, F.Z. and Simeonova, B.G., 2013. Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe. Springer Netherlands.
- Simoniello, M.F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Mastandrea, C., Grigolato, R. A., Paonessa, A. M. and Carballo, M. A. 2010b. Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in arural population. *Biomarkers*, 15: 52–60.
- Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Chandna, S., Rautela, R.S., Grover, S.S, Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L. and Rai, A. 2011. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environmental Toxicology Pharmacology*, 31: 278–285.
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccinillo, V.J., Sargent, D., Stevens J.T. and Weiner, M.L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59.
- Soderlund, D.M. and Bloomquist, J.R. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34: 77–96.
- De Souza, A., Medeiros Ados, R., De Souza, A.C., Wink, M., Siqueira, I.R., Ferreira, M.B., Fernandes, L., Loayza Hidalgo, M.P. and Torres, I.L. 2011. Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). *Cien Saude Colet*, 16 (8): 3519–3528.
- Stephenson, R. and Metcalfe, N.H. 2013. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 43:70–5.
- Sundseth, S.S., Nix, C.E. and Sulari L.C. 1990. Isolation of insecticide resistance-related forms of cytochrome P-450 from *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal*, 265(1): 213-217.
- Suzuki, H. and Suzuki, N. 1995. Piperonyl butoxide mutagenicity in human RSa cells. *Mutation Research*, 344: 27-30.
- Suzuki, T., Jin, M., Dewa, Y., Ichimura, R., Shimada, Y., Mizukami, S., Shibutani, M. and Mitsumori, K. 2010. Evaluation of in vivo liver genotoxic potential of

- Wy-14,643 and piperonyl butoxide in rats subjected to two-week repeated oral administration. *Arch Toxicol*, 84:493–500.
- Sümer, S., Diril, N. and İzbirak, A. 1990. *Salmonella* / Mikrozom test sistemi ile bazı insektisitlerin mutajeniteleri üzerine bir çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 24: 103-110.
- Symington, S.B., Hodgdon, H.E., Frisbie, R.K. and Clark, J.M. 2011. Binary mixtures of pyrethroids produce differential effects on Ca²⁺ influx and glutamate release at isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 131–139.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejja, G. 1983. Testing the mutagenicity of Malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutation Research*, 113: 117-133
- Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. 2011. Genetik Toksisite Testleri. *TÜBAV Bilim*, 4(3): 221-229.
- Şener, S. ve Yıldırım, M. 2000. Veteriner Toksikoloji. Teknik yayıncılık, İstanbul, s. 163-164.
- Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T. and Yoneyama, M. 1997. Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: induction of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 26; 124(2):95-103.
- Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T. and Yoneyama, M. 1994. Piperonyl butoxide induces hepatocellular carcinoma in male CD-1 mice. *Arch Toxicol*, 68(7): 467-9.
- Takahashi, O., S. Oishi, T. Fujitani, T. Tanaka and M. Yoneyama. 1994a. Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in F 344 rats: Induction of hepatocellular carcinoma. *Fundamental and Applied Toxicology*, 22: 293-303.
- Takahashi, O., S. Oishi, T. Fujitani, T. Tanaka and M. Yoneyama. 1994b. Piperonyl butoxide induces hepatocellular carcinoma in male CD-1 mice, *Arch Toxicol*, 68: 467-469.
- Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O. and Oishi, S. 1994. Developmental toxicity evaluation of piperonyl butoxide in CD-1 mice. *Toxicology Letters*, 71(2):123-129.
- Tanaka, T. 2003. Reproductive and neurobehavioural effects of piperonyl butoxide administered to mice in the diet. *Food Additives Contaminants*, 20(3):207-14.

- Tasaki, M., Kuroiwa, Y., Inoue, T., Hibi, D., Matsushita, K., Ishii, Y., Maruyama, S., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Umemura, T. 2013. Oxidative DNA damage and *in vivo* mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of p53-proficient or -deficient gpt delta mice treated with non-genotoxic hepatocarcinogens. *Applied Toxicology*, 33:1433–1441.
- Tan, J. and Soderlund, D.M. 2010. Divergent actions of the pyrethroid insecticides S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin on rat Nav1.6 sodium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247:229–37.
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S. and Yan, D. 2018. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*.191: 990-1007.
- Tayyaba, A., Muhammad, I., Farkhanda, A., Asma, A., Usman, W., and Qaiser M. K. 2018. Pesticide genotoxicity in cotton picking women in Pakistan evaluated using comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2): 213–220.
- Tayama, S. 1996. Cytogenetic effects of piperonyl butoxide and safrole in CHO-K1 cells. *Mutation Research*, 368: 249-260.
- Tiryaki, O., Canhilal, R. and Horuz, S. 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2): 154-169.
- Tisch, M., Faulde, M. and Maier, H. 2007. Genotoxic effects of insecticides in current use on mucosal epithelial cells from human tonsil tissue. *Hals Nasen Ohrenheilkunde*, 55: 15-22.
- Tisit. 2018. Tarım ilaçları sanayici, ithalatçı ve temsilcileri derneği. tisit.org.tr/pdf_dosya/pestisit_ve_pestisitlerin_siniflandirilmesi.pdf. [Son erişim tarihi: 24.05.2018].
- Torres, D.P., Munoz, S.S., Sanchez, D. and Ganfornina, M.D. 2011. Construction of an NLaz: Gal4 driver for controlled gene expression in *Drosophila melanogaster*.
- Tripathy, N.K., Würgler, F.E. and Frei, H.1990. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 242(3):169-80.
- Tumer, T.B., Saranoğlu, S., Atmaca, P., Terzioğlu, G., Sen, A. and Arslan, S. 2016. Modulatory role of GSTM1 null genotype on the frequency of micronuclei in pesticide-exposed agricultural workers. *Toxicology and Industrial Health*, 32(12): 1942–1951.

- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), 2007. Pesticides: Health and Safety. National Assessment of the Worker Protection Workshop #3. (Available at:) <http://www2.epa.gov/pesticide-worker-safety>.
- USEPA. 2013a. Common mechanism grouping for the pyrethrins and synthetic pyrethroids. EPA-HQ-OPP-2011-0746-0003. Washington: USEPA.
- USEPA. 2008. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008-2012. Market Estimates.
- Umemura, T., Kuroiwa, Y., Kitamura, Y., Shii Kanki, K., Kodama, Y., Itoh, K., Yamamoto, K. and Hirose, M. 2006. A crucial role of Nrf in in vivo defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol Sciences*, 90: 111–9.
- University of Cambridge. 2015. <http://www.cam.ac.uk/research/features/how-close-are-you-to-a-fruit-fly>. [Son erişim tarihi: 24.05.2018].
- Ündeğer, Ü. ve Başaran N. 2002. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch Toxicol*, 76: 430–436.
- Van Maele-Fabry, G., Hoet, P., Vilain, F. And Lison, D. 2012. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ. Int.*, 46: 30-43.
- Vanschalk, N. and Graf, U. 1991. Genotoxicity evaluation of 5 tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 260(1): 99-104.
- Vardavas, AI., Stivaktakis, P.D., Tzatzarakis, M.N., Fragkiadaki, P., Vasilaki, F., Tzardi, M., Datseri, G., Tsiaoussis, J., Alegakis, A.K., Tsitsimpikou, C., Rakitskii, V.N., Carvalho, F. and Tsatsakis, A.M. 2016. Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*, 94:250-259.
- Vecchio, G. 2015. A fruit fly in the nanoworld: once again *Drosophila* contributes to environment and human health. *Nanotoxicology*, 9,2: 135-137.
- Vijayalakshmi, M. 2013. *Drosophila melanogaster*-Life Cycl. NPTEL Biotechnology -Systems Biology.
- Vijverberg, H. P. M., Zalm J. M., and Bercken, J. V. 1982. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature.*, 295: 601-603.

- Vogel, E.W. 1986. O-Alkylation in DNA does not correlate with the formation of chromosome breakage events in *D. Melanogaster*. *Mutation Research*, 162(2): 201-213.
- Vural, N., 2005. "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen R. 2000. Cytochromes P450: A Success Story. *Genome Biol.* 1(6):Reviews3003.
- Weir, R.J. and Crews, L.M. 1966. Three month dietary administration to dogs of Neopynamin - final report (Technical Report No. IT-61-0011) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- White, T.J., Goodman, D., Shulgin, A.T., Castagnoli, N., Lee, R. and Petrakis, N.L., 1977. Mutagenic activity of some centrally active aromatic amines in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 56, 199e202.
- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C. and Shaw, J. 2011. Idf diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 94: 311–321.
- WHO, 2009 The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification.
- WHO, 2015. World cancer report 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>.
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G. and Jones, K.C. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. *Science Total Environmental*, 511:123–137.
- Yadav, S., Singh M.K. and Yadav, R.S. 2016. Organophosphates Induced Alzheimer's Disease: An Epigenetic Aspect. *Journal of Clinical Epigenetics*, 2:1-10.
- Yardımcı, M., Sevgiler. Y., Rencuzogullari, E., Arslan, E., Büyükleyla, M. and Yılmaz, M. 2014. Sex tissue, and exposure duration-dependent effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part I: oxidative and neurotoxic potentials. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 65:387–398.
- Yavuz, O., Aksoy, A., Das, Y.K., Gulbahar, M.Y., Yarim, G.F., Cenesi, M., Atmaca, E. and Güvenç, D. 2010. Repeated-dose 14-day dermal toxicity of different combinations of some synthetic pyrethroid insecticides, piperonyl butoxide, and tetramethrin in rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 29(1): 16-25.

- Yavuz, O., Aksoy, A., Das Y.K., Gülbahar, M.Y., Güvenç, D., Atmaca, E., Yarim F.G. and Çenesiz M. 2015. Subacute oral toxicity of combinations of selected synthetic pyrethroids, piperonyl butoxide, and tetramethrin in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 31(4): 289–297.
- Yavuz, O. and Aksoy, A. 2016. Pestisit Analizlerinde Kullanılan Metotlar. *Türkiye Klinikleri J. Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2,2.
- Yoshitake, A., Kogiso, S., Yamada, F., Hara, M. and Miyamoto, J. 1987. *Reverse mutation test of Neopynamin in Salmonella typhimurium and Escherichia coli* (Technical Report No. IT-70-0205) (Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co.).
- Yoo, M., Lim, Y.H., Kim, T., Lee, D. and Hong, Y. C. 2016. Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in Korean adults: 1st Korean.
- Yorulmaz, S. ve Ay, R. 2010. Akar ve böceklerde pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler. *U. Ü. Ziraat fakültesi dergisi*, Cilt 24, 2; 137-148 (Journal of Agricultural Faculty of Uludag University).
- Young, R.R. 2002. Genetic toxicology: *web resources Toxicology*, 173(1–2): 103-121.
- Yurdakök-Dikmen, B., Vejselova, D., Kutlu, H.M, Filazi, A. and Erkoç, F. 2017. Effects of synthetic pyrethroids on RTG-2 cells. *Toxin Reviews*.
- Yüksel, N. 2001. Sitokrom P450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri. *Klinik Psikiyatri Ek* 1:5-16. 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi'nde (Trabzon) sunulmuştur.
- Zhao, L. N. 2014. Residue and Risk Assessment of 7 Kinds of Pyrethroids in Water Environment in the Pearl River Delta (Master thesis). Shanghai Ocean University, Shanghai, China.
- Zeljezic, D. and Garaj-Vrhovac, V. 2001. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis*, 16(4): 359-363.
- Zhang, W. J., Jiang, F. B. and Ou, J. F. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2): 125–144.
- Zhang, Z.Y., Yu, X.Y., Wang, D.L., Yan, H.J. and Liu, X.L. 2009. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four Pyrethroids and their binary mixtures. *Society of Chemical Industry. Pest Manag Sci.*, 66: 84–89.
- Zijlstra, J.A., Vogel, E.W., Breimer, D.D. 1987. Pharmacological and toxicological aspects of mutagenicity research in *Drosophila melanogaster*. In: Hodgson

E, Bend J, Philpot RM(eds) *Reviews in biochemical toxicology*, 8. Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp.121–154.

Zordan, M., Graf, U., Singer, D., Beltrame, C., Dalla Valle, L., Osti, M., Costa, R. and Levis, A.G. 1991. The genotoxicity of nitrilotriacetic acid (NTA) in a somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 262(4):253-6.



HAVVA ERTUĞRUL

hvertugrul@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2016-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2011- 2015	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya