



**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FLUMETRALİN'İN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDE  
KROMOZOM ANORMALLIĞI VE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**SEVCAN BUCAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
HAZİRAN – 2015**



T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLUMETRALİN'İN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDE  
KROMOZOM ANORMALLİĞİ VE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Sevcan BUCAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
HAZİRAN-2015  
T.C.**

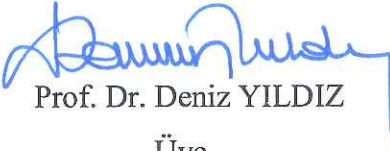
T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLUMETRALİN'İN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDE  
KROMOZOM ANORMALLIĞI VE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU ÜZERİNE  
ETKİLERİ

SEVCAN BUCAK  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç.Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 29.06.2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN  
Başkan

  
Prof. Dr. Deniz YILDIZ  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Hatice DANAHALİLOĞLU  
Üye

Kod No: 8 4 9

Doç. Dr. Okan ŞENER  
Enstitü Müdür V.

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 282

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirislerin, çizelge, sekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

**29.06.2015**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılmayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**SEVCAN BUCAK**

## ÖZET

### FLUMETRALİN'İN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİTLERİNDE KROMOZOM ANORMALLİĞİ VE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada, 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına ve herbisidal aktiviteye sahip bir sentetik bitkibüyüme düzenleyicisi olan flumetralinin genotoksik ve sitotoksik etkisi insan periferal kan lenfositlerinde *in vitro* kromozom anormalliği (KA) ve sitokinez-bloklama mikronükleus (MN) testleri ile araştırılmıştır. Hücreler, 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir.

Flumetralin, yüksek üç konsantrasyonda (250, 500 ve 1000 µg/ml) ve her iki uygulama süresinde (24 ve 48 saat) yapısal KA frekansını hem negatif hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırmıştır. Ayrıca, flumetralin MN oluşumunu 24 saatlik muamelenin yüksek konsantrasyonlarında (250, 500 ve 1000 µg/ml) ve 48 saatlik muamelenin 125 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttırmıştır. 48 saatlik muamelenin yüksek iki konsantrasyonunda (500 ve 1000 µg/ml) yüksek toksisiteden dolayı yeterli sayıda binükleer hücre tespit edilememiştir. Ayrıca, flumetralin tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde, mitotik indeks ve nükleus bölünme indeksini kontrol gruplarına göre önemli derecede düşürmüştür. Bu sonuçlar, flumetralinin test edilen konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde önemli klastojenik ve sitotoksik/sitostatik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

2015, 59 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Flumetralin, insan periferal kan lenfositleri, kromozom anormalliği, mikronükleus.

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF FLUMETRALIN ON CHROMOSOME ABERRATIONS AND MICRONUCLEUS FORMATION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

In the present study, the genotoxic and cytotoxic effects of flumetralin, a synthetic plant growth regulator with herbicidal activity belonging to the 2,6-dinitroaniline class of chemicals, were investigated in vitro by chromosome aberrations (CAs) and cytokinesis-block micronucleus (MN) tests in human peripheral blood lymphocytes. The cells were treated with 125, 250, 500, and 1000 µg/ml flumetralin for 24 and 48 hr.

Flumetralin statistically significantly increased the frequency of structural CAs at the three highest concentrations (250, 500, and 1000 µg/ml) for both treatment periods (24 and 48 hr) when compared with both the negative and solvent controls. In addition, MN formation was significantly induced at higher concentrations (250, 500, and 1000 µg/ml) for 24 hr and at 125 and 500 µg/ml of flumetralin for the 48-hr treatment period compared with the controls. Due to excessive toxicity binuclear cells could not be detected sufficiently in the highest two concentration of flumetralin (500 and 1000 µg/ml) for 48 hr treatment times. Furthermore, flumetralin significantly decreased the mitotic index and nuclear division index for all concentrations and treatment times as compared to control groups. The present results may indicate that flumetralin had a significant clastogenic and cytotoxic/cytostatic effects at the tested concentrations for the human lymphocytes.

2015, 59 Pages

**Key words:** Flumetralin, human peripheral blood lymphocytes, chromosome aberrations, micronucleus.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince değerli katkıları ile tez konumun seçilmesinde ve oluşturulmasındaki yol göstericiliği, özellikle laboratuvar çalışmalarındaki sabrı için danışmanım Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN' a teşekkür ederim.

Preparatların hazırlanmasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşlarıma, tez çalışmamı maddi yönden destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Kurulu yöneticilerine teşekkür ederim.

Ayrıca, yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini ve anlayışlarını benden esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET.....  | I    |
| ABSTRACT.....  | II   |
| TEŞEKKÜR.....  | III  |
| İÇİNDEKİLER.....   | IV   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | VI   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | VIII |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....   | IX   |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....  | 5    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....   | 11   |
| 3.1. Materyal.....   | 11   |
| 3.1.1. Flumetralin.....  | 11   |
| 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....   | 12   |
| 3.2.1. Flumetralin (Sigma-Aldrich).....  | 12   |
| 3.2.2. Mitomycin C (MMC) (Sigma).....  | 13   |
| 3.2.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma).....  | 13   |
| 3.2.4. Kromozom Medyumu.....   | 14   |
| 3.2.5. Kolkisin (Sigma).....   | 14   |
| 3.2.6. Hipotonik Eriyik.....   | 15   |
| 3.2.7. Fiksatif.....   | 15   |
| 3.2.8. Sorensen Tamponu.....   | 15   |
| 3.2.9. Giemsa (Merck).....   | 16   |
| 3.2.10. Sitokalasin B (Cytochalasin B).....  | 16   |
| 3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları.....   | 16   |
| 3.3.1. Santrifüj.....  | 16   |
| 3.3.2. Mikroskop.....  | 17   |
| 3.3.3. İnkübatör.....  | 17   |
| 3.3.4. Flow Kabin (Steril Kabin).....  | 17   |
| 3.4. Lamların Temizlenmesi.....  | 17   |
| 3.5. Yöntem.....   | 17   |
| 3.5.1. Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması..... | 17   |
| 3.5.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....   | 18   |
| 3.5.1.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....  | 19   |
| 3.6. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....   | 19   |
| 3.6.1. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....   | 19   |
| 3.6.1.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....   | 19   |
| 3.6.1.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....   | 20   |

|   |    |
|---|----|
| 3.7. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması ..... | 20 |
| 3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması .....                                       | 21 |
| 3.7.2. Preparatların Boyanması .....  | 21 |
| 3.8. Mikronükleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme .....                            | 22 |
| 3.8.1. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması .....                             | 22 |
| 3.9. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi .....  | 25 |
| 3.10. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi .....  | 25 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....  | 27 |
| 4.1. Flumetralinin İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri .....                          | 27 |
| 4.1.1. Flumetralinin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....                      | 27 |
| 4.1.2. Flumetralinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....                                    | 39 |
| 4.2. Flumetralinin İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Sitotoksik/Sitostatik Etkileri .....               | 44 |
| 4.2.1. Flumetralin'in Mitotik İndeks (MI ) Üzerine Etkisi .....   | 44 |
| 4.2.2. Flumetralinin Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerindeki Etkileri .....                                | 46 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....  | 50 |
| KAYNAKLAR .....   | 52 |
| ÖZGEÇMİŞ .....  | 59 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 3.1. Bir nükleuslu hücre (x1000) .....   | 23 |
| Şekil 3.2. İki nükleuslu hücre (x1000) .....   | 23 |
| Şekil 3.3. Üç nükleuslu hücre (x1000) .....  | 24 |
| Şekil 3.4. Dört nükleuslu hücre (x1000) .....  | 24 |
| Şekil 3.5. Mikroskopta fotoğraf çekimi .....   | 25 |
| Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda flumetralin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ..... | 29 |
| Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda flumetralin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde anormal hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı .....            | 29 |
| Şekil 4.3. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (250 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 30 |
| Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♂) x1000 .....   | 30 |
| Şekil 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (250 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 31 |
| Şekil 4.6. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (1000 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 31 |
| Şekil 4.7. Kromozom fragmenti (F) bulunan metafaz plağı (500 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♂) x1000 .....   | 32 |
| Şekil 4.8. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (125 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 32 |
| Şekil 4.9. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (125 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000 .....   | 33 |
| Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (125 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....  | 33 |
| Şekil 4.11. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (1000 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....  | 34 |
| Şekil 4.12. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (1000 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 34 |
| Şekil 4.13. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (1000 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 35 |
| Şekil 4.14. Poliploidili (P) metafaz plağı (500 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000 .....  | 35 |
| Şekil 4.15. Endoreduplikasyonlu (E) metafaz plağı (125 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 36 |
| Şekil 4.16. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (125 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000 .....   | 40 |
| Şekil 4.17. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (125 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000 .....   | 41 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4.18. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (250 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂). x1000.....   | 41 |
| Şekil 4.19. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (1000 µg/ml flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000.....   | 42 |
| Şekil 4.20. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (250 µg/ml flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000.....  | 42 |
| Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde MI'nin konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı ..... | 46 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 4.1. Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde kromozom anormallikleri....                                | 28 |
| Çizelge 4.2. Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre %' si ve % MN .....          | 40 |
| Çizelge 4.3. Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde MI, nükleus sayısına göre hücrelerin dağılımı ve NBI ..... | 45 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

|       |   |
|-------|---|
| B'    | : Kromatid Kırığı                         |
| B''   | : Kromozom Kırığı                         |
| ER    | : Endoreduplikasyon                       |
| F     | : Fragment                                |
| µg/l  | : Mikrogram/litre                         |
| µg/ml | : Mikrogram/mililitre                     |
| µl    | : Mikrolitre                              |
| MI    | : Mitotik İndeks                          |
| µM    | : Mikromolar                              |
| MN    | : Mikronükleus                            |
| N     | : Toplam hücre sayısı                     |
| P     | : İstatistiksel olarak önemlilik derecesi |
| Ppm   | : Milyonda bir                            |
| r     | : Regresyon                               |
| UV    | : Ultraviyole                             |

### KISALTMALAR

|                  |  |
|------------------|--|
| BCF              | : Biyolojik Konsantrasyon Faktörü          |
| BGD              | : Bitki Gelişim Düzenleyicileri            |
| Bw               | : Body Weight (Vücut Ağırlığı)             |
| Cat. No.         | : Katalog Numarası                         |
| CBPI             | : Sitokinez Bloklama Proliferasyon İndeksi |
| CHO              | : Chinese Hamster Ovaryum                  |
| ÇK               | : Çözücü Kontrol                           |
| DMSO             | : Dimethyl Sulfoxide                       |
| DNA              | : De(z)oksisiribonükleik asit              |
| DS               | : Disentrik Kromozom                       |
| EC               | : Medyan Etkin Konsantrasyon               |
| EFSA             | : Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi          |
| EPA              | : Çevre Koruma Ajansı                      |
| HNO <sub>3</sub> | : Nitrik Asit                              |
| KA               | : Kromozomal Anormallik                    |
| KKB              | : Kardeş Kromatid Birleşmesi               |
| KKD              | : Kardeş Kromatid Değişmesi                |
| KCl              | : Potasyum klorür                          |
| LC               | : Öldürücü Konsantrasyon                   |
| MMC              | : Mitomycin C                              |
| MNBN             | : Mikronükleuslu binükleer hücre           |
| MN/hücre         | : Hücre başına düşen mikronükleus sayısı   |

|       |  |
|-------|--|
| MTT   | : 3-4,5-Dimethyl thiazol-2—yl 2,5-diphenyl tetrazolium bromide testi |
| NaCl  | : Sodyum Klorür  |
| NBI   | : Nükleus Bölünme İndeksi  |
| NBUD  | : Nükleer tomurcuk   |
| PAN   | : Pestisit Etkisi Uluslararası Ağı                                   |
| PCE   | : Polikromatik Eritrosit   |
| PI    | : Proliferasyon indeksi  |
| PK    | : Pozitif Kontrol  |
| RAPD  | : Random Amplified Polymorphic DNA                                   |
| RI    | : Replikasyon İndeksi  |
| SMART | : Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi                            |
| USEPA | : Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı                    |
| WHO   | : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)                    |

## 1. GİRİŞ

Yeryüzündeki canlıların gıda zincirinin ana halkasını, bitkisel hammaddeler oluşturmaktadır. Bu nedenle öncelikle bitkisel ürünlerde artış hedeflenmiştir.

İnsektisit, herbisit, fungusit ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi sentetik kimyasalları içeren pestisidler günümüz modern tarımında ürün kalitesini arttırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, tarımda kullanılan bu kimyasalların gelişigüzel ve yüksek oranda kullanımı çevre ve insan sağlığına zararlı olabilmektedir. Bu pestisitlerin bazılarının birçok yan etkilerinin yanında kanserojenik, teratojenik, mutajenik ve immünotoksik gibi olumsuz etkilere de sahip olabileceği saptanmıştır (IARC, 1991; Dearfield ve ark., 1999).

Flumetralin herbisidal aktiviteye de sahip olan sentetik bir bitki gelişim düzenleyicisidir (Weber, 1990). Bitki büyüme ve gelişmesini etkileyen, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilen hem doğal hem de sentetik maddelere bitki gelişim düzenleyicileri adı verilmektedir (Sade, 2000). Günümüzde hormonlar ile bitki gelişim düzenleyicileri kavramları arasında anlam karmaşası vardır. Bitki büyüme düzenleyicileri kavramı; bitki büyümesini etkilediği belirlenen hem doğal hem de sentetik maddeler için kullanılırken, hormon terimi sadece bitkilerde doğal olarak bulunan maddeler için kullanılmaktadır (Aydoğdu ve Boyraz, 2005).

Bitkiler büyüme, gelişme ve değişime uğramaları için kendi hormonlarını kendileri üretirler. Fakat doğal yollarla üretilen hormonların tarımda kullanılmaları oldukça pahalıya mal olmaktadır. Sentetik olan bitki gelişim düzenleyicileri, daha ekonomik olarak üretildiğinden dolayı tarımsal üretimde özellikle sera üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Babaoğlu, 2002).

Sentetik bitki gelişim düzenleyicileri ışık ve ısıdan etkilenmezler. Zor metabolize olurlar ve dolayısıyla vücuttan atılmazlar yani kalıntı etkisi yaparlar. Bu nedenle hücrelerde birikip, besin zinciri yoluyla bir canlıdan diğerine geçebilirler (Marcano ve ark., 2004; Morsünbül ve ark., 2010).

Molekül formülü  $C_{16}H_{12}ClF_4N_3O_4$  ve kimyasal formülü N-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-N-ethyl-2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)aniline olan flumetralin, 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil olup, sahip olduğu herbisit/gelişim düzenleyici etkinliği taşıdığı olduğu dinitroanilin grubundan kaynaklanmaktadır (USEPA, 2007).

Dinitroanilinler, mikrotübül polimerizasyonunu engelleyici kimyasallar olarak bilinirler ve bazılarının (oryzalin, trifluralin gibi) bitki túbülinlerindeki antimikrotübül etkileri çok iyi bir şekilde ortaya konulmuştur (Morejohn ve ark., 1987; Morejohn ve Fosket, 1991; Antony ve Hussey, 1999). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar sonucunda, dinitroanilinlerin seçici bir şekilde bitki ve protozoa miktotübüllerini inhibe ettiği fakat fungal ve omurgalılarıdaki mikrotübüllere etki edemediği belirlenmiştir (Morejohn ve Fosket, 1986; Morissette ve ark., 2004).

Günümüzde flumetralin, tütün bitkilerinde aksiler tomurcuğun (koltukaltı tomurcuğu, yan tomurcuk) büyümesini kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Weber, 1990; Hermann ve ark., 2000). Bu kimyasal madde, tütün bitkisinde yan tomurcuğun büyümesini inhibe ederek bitkinin gelişimini engellemektedir. Flumetralin, toprağa sprey şeklinde, büyüme dönemi boyunca yalnızca bir kez; tütün bitkilerinin çiçek kısımları çıktıktan sonra 3 ile 7 gün arasında uygulanmakta ve uygulandıktan sonra birkaç saat içinde tütün bitkisi tarafından emilmektedir. Böylece, büyüme dönemi boyunca yan tomurcukların büyüme kontrolünü sağlamaktadır (USEPA, 2007).

Flumetralin, genellikle tütülenmiş, Burley, Maryland ve puro tütün bitkilerinin aksillar tomurcuklarının kontrolü için kullanılmaktadır (USEPA, 2007). Flumetralinin ilk olarak 1983 yılında Prime<sup>+</sup>, Flupro, and Drexalin Plus adlı ticari isimleri ile kullanılmaya başladığı EPA (Environmental Protection Agency) tarafından kayıt altına alınmıştır (Coresta, 2014).

Tarımda kullanılan tüm kimyasal maddelerde olduğu gibi flumetraline maruz kalma, mesleki (pestisidin üretildiği ve kullanıldığı yerlerde, genellikle soluma veya dermal yolla meydana gelen maruziyet) ve çevresel (içme suyuna karışma gibi) yollarla olabilmektedir. Fakat, flumetralin özellikle tütün ürünlerinde kullanıldığı için, insanlar bu kimyasala sigara, puro içme veya tütün çiğneme ile de maruz kalmaktadırlar (USEPA, 2014).

Flumetralin, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA) tarafından 2007 yılında “hafif toksik” (USEPA, 2007), 2014 yılında insanlar için “kanserojenik olması muhtemel değil” (USEPA, 2014) şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu kimyasal madde, yine 2014 yılında EFSA (European Food Safety Authority=Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından “genotoksik olması muhtemel değil” şeklinde

sınıflandırılırken (EFSA, 2014), aynı yıl içinde PAN (Pesticide Action Network International = Pestisit Etkisi Uluslararası Ağı) tarafından “yüksek derecede zararlı pestisidler listesi”ne eklenmiştir (PAN, 2014). Flumetralininin toksik etkisiyle ilgili olarak bu farklı sınıflandırmalar göz önüne alındığında, bu kimyasal maddenin insanlar üzerindeki muhtemel genotoksik etkilerinin belirlenmesinin önemli olduğu kanaatindeyiz.

PAN (2014) tarafından, flumetralininin sucul organizmalar üzerinde yüksek toksik etki gösterdiği (LC/EC 50 [48 saat] *Daphnia* spp. < 0,1 mg/l) ve yüksek biyoakümülatif potansiyele sahip olduğu (bioconcentration factor, BCF>5000) bildirilmiştir. Flumetralininin biyolojik olarak yüksek birikime sahip olması özelliğinden dolayı, bu maddenin organizmalarda ve çevrede toksik seviyelere kadar birikebilmesi ve sonunda bu maddeye maruz kalan bitki, hayvan ve insanların genetik materyallerinde hasara neden olabilmesi muhtemeldir. Çünkü, pestisidlere düşük miktarlarda olsa bile uzun süreli maruziyetin kanser ve diğer genetik bozukluklara neden olduğu çok iyi bilinmektedir (Zahm ve Blair, 1992).

Ayrıca, daha fazla ürün elde edebilmek için bitki büyüme düzenleyicilerinin aşırı miktarlarda kullanılması, bu maddelerin canlılar üzerinde genotoksik etkilere sahip olabilme potansiyelini arttırmaktadır (Marcano ve ark., 2004). Bu nedenle bitki büyüme düzenleyicilerinin muhtemel genotoksik risklerinin belirlenmesi ve toplumun bu konuda bilinçlendirilmesi önem arz etmektedir.

Literatür araştırmamıza göre flumetralininin genotoksik veya sitotoksik potansiyelini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat, flumetralininin dahil olduğu 2,6-dinitroanilin grubuna giren birçok kimyasalın (fluchloralin, trifluralin, pendimethalin gibi) çeşitli test sistemlerinde ve hücre hatlarında genotoksik, sitotoksik ve mutajenik olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Panneerselvam ve ark., 1995; Sinha ve ark., 1998; Ghiazza ve ark., 1984; Ribas ve ark., 1995; Gebel ve ark., 1997; Könen ve Çavaş, 2008; Yamano ve Morita, 1995; Pan ve ark., 2004; Dimitrov ve ark., 2006; Patel ve ark., 2007; Kaya ve ark., 2004, Bozari ve Aksakal, 2013). Bu nedenle de, flumetralininin insanlar üzerindeki muhtemel genotoksik potansiyelinin araştırılmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz.

Mutajen ve kansorejenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden ikisi; insan periferik kan lenfositlerindeki kromozom anormalliği

(KA) frekansının (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark., 1994; Bonassi ve ark., 2004; 2005; 2007) ve mikronükleus (MN) oluşumunun değerlendirilmesidir (Heddle ve ark.,1991 ;Fenech, 2002a, Bonassi ve ark., 2011).

Kromozomal anormallikler; kromozomlarda meydana gelen ve mikroskobik düzeyde gözlenebilen yapısal ya da sayısal değişiklikleri ifade eder. Çeşitli ajanların etkisiyle meydana gelen kromozomal hasarlar, DNA'daki onarılmamış tek/çift zincir kırıklarından veya DNA'daki zincir kırıklarının yanlış tamir edilmesinden ve kromozomların kutuplara hareketi sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanmaktadır.

Mikronükleus, asentrik kromozom (mitozda veya mayozda kutuplara göç edemeyen sentromersiz kromozom veya kromozom parçası) ya da kromatid kırıklarından ve tüm kromozomlar ya da kromatidlerin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan kardeş çekirdeklerin dışında rastlanan küçük çekirdeklerdir (Surrallés ve ark., 1995). Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da (anafaz ve telofaz sırasında hücrede ikiden fazla kutup oluşması) MN oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Norppa ve Falck, 2003).

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik araştırmalar (kohort ve vaka-kontrol çalışmaları), insan periferel lenfositlerindeki artmış KA ve MN frekansının kanser riskinin bir belirleyicisi olduğunu göstermiştir (Bonassi ve ark., 1995; Hagmar ve ark., 1998; Liou ve ark., 1999; Fenech, 2002b; Hagmar ve ark., 2004; Rossner ve ark., 2005; Norppa ve ark., 2006; Bonassi ve ark., 2007; Bonassi ve ark., 2008; Iarmarcovai ve ark., 2008; Murgia ve ark., 2008; Bonassi ve ark., 2011; El-Zein ve ark., 2011).

Günümüzde, etkinliği ve kolaylığından dolayı insan periferel kan lenfositlerindeki KA ve MN testleri, yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin ve sitotoksik etkilerin incelenmesi için popüler ve kullanışlı bir yöntem haline gelmiştir (Fenech ve ark., 2011; Bonassi ve ark., 2008).

Bu çalışmanın amacı; 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil bir sentetik bitki büyüme düzenleyicisi olan flumetralinin insan periferel kan lenfositlerindeki muhtemel genotoksik ve sitotoksik etkilerini, *in vitro* KA ve MN testleri kullanarak araştırmaktır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ghiazza ve ark. (1984) tarafından yapılan çalışmada, trifluralinin insan lenfosit hücrelerinde KKD frekansını kontrole kıyasla önemli derecede arttırarak genotoksik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (hücre başına düşen KKD frekansı: trifluralin  $5.27 \pm 1.38$ ; kontrol  $3.51 \pm 1.14$ ).

Pilinskaia, (1987) Trifluralin ve onun ticari formu olan treflan (etken madde olarak % 25 trifluralin) kültüre edilmiş insan lenfositlerinde *in vitro* olarak ve fare kemik iliği hücrelerinde *in vivo* olarak KA sayısını arttırmamıştır.

Panneerselvam ve ark. (1995), kültüre edilmiş insan lenfositlerine 3 farklı konsantrasyondaki (2.5, 5.0 ve 10 µg/ml) fluchloralini 24 ve 48 saat muamele ederek kromozomal anormallikleri değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından, tüm konsantrasyonlardaki fluchloralinin bu hücrelerde konsantrasyona bağlı bir şekilde kromatid tipi anormallikleri önemli derecede arttırdığı; 48 saatlik uygulamadan sonra yine tüm konsantrasyonlarda multipolar (çoklu) anormalliklerin gözlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, aynı çalışmalarında elde ettikleri sonuçları desteklemek için, fluchloralinin genotoksik etkisini insan lenfositlerinde sitokinez bloklayıcı MN testi kullanarak da belirlemişlerdir. Yaptıkları MN testine göre; araştırmacılar tarafından, düşük konsantrasyonlardaki (2.5-10 µg/ml) fluchloralinin arttırdığı MN sayısının kontrolden önemli derecede farklı olmadığı; fakat daha yüksek konsantrasyonlarda (20, 40 ve 50 µg/ml) mikronükleuslu hücre sayısının konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli derecede arttığı; bu nedenle fluchloralinin insan lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Ribas ve ark. (1995), trifluralinin insan periferel kan lenfositlerindeki genotoksik etkisini tek-hücre jel elektroforezi (komet) testini kullanarak, S9 mix varlığında ve yokluğunda araştırmışlardır. 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki trifluralinin insan lenfositlerinde DNA hasarısının bir göstergesi olan komet (kuyruklu yıldız) kuyruk uzunluğunun artışına neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, trifluralinin uyardığı genotoksik hasarın eksojen metabolik aktivatör olan S9 mix yokluğunda daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ribas ve ark. (1996) tarafından, trifluralinin genotoksik etkisi kültüre edilmiş insan periferel kan lenfositlerinde KKD, KA ve MN testleri kullanılarak

değerlendirilmiştir. Araştırmacılar tarafından, trifluralinin proliferasyon indeksini (PI) ve sitokinez bloklayıcı proliferasyon indeksini (CBPI) kontrole göre düşürdüğü fakat zayıf sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, KKD frekansında az fakat istatistiksel olarak önemli artış meydana geldiği (S9 mix yokluğunda, 50 µg/ml konsantrasyonda 48 saat muamele; S9 mix varlığında, 200 µg/ml konsantrasyonda 2 saat muamele) bildirilmiştir. Fakat, araştırmacılar yaptıkları KA testinde (S9 mix yokluğunda, 1, 5, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında 48 saat muamele) ve MN testinde (S9 mix yokluğunda, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında 48 saat muamele; S9 mix yokluğunda ve varlığında 25, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında 2 saat muamele) tüm süre ve konsantrasyonlarda trifluralinin genotoksik etkisinin görülmediğini bildirmişlerdir.

Várnagy ve ark. (1996) tarafından flubalex (etken madde olarak % 20 benfluralin içeren ticari formülasyon)'in tavuk embriyoları üzerine teratojenik etkisi çalışılmıştır. Araştırmacılar, yumurtaların hava boşluğuna (air-chamber) 12 gün boyunca uygulanan test maddesinin embriyoların önemli derecede ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir.

Gebel ve ark. (1997) tarafından, pendimethalinin fare kemik iliği hücrelerinde *in vivo* MN testine göre herhangi bir genotoksik etkisinin bulunmadığı ve ne dişi ne de erkek farelerde MN oluşumunu önemli derecede arttırmadığı bildirilmiştir.

Pendimethalinin ticari formülasyonu olan stomp herbisidinin genotoksik etkisi bitki (*Crepis capillaris* L.) ve fare kemik iliği hücrelerinde KA ve MN testi kullanılarak belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışmaya göre, her iki test sisteminde oldukça farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar tarafından, stompun bitki hücrelerinde KA'yı arttırmadığı, fakat fare kemik iliği hücrelerinde (1/2 LD<sub>50</sub>=489 mg/kg b.w.) KA frekansını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, araştırmacılar stompun hem bitki hücrelerinde (% 0.005-0.4 konsantrasyonlarda ve 4, 16, 24 saat muamele sürelerinde) hem de fare kemik iliği hücrelerinde (1/2 LD<sub>50</sub>= 489 mg/kg b.w dozunun tek bir defa 96 saat süre ile uygulanması veya 1/8 LD<sub>50</sub>= 122 mg/kg b.w dozunun 5 gün boyunca ardı ardına uygulanmasının) MN frekansını önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, bitki hücrelerindeki MN artışının herbisidin iğ ipliği oluşumunu bozucu etkisinden kaynaklanmış olabileceğini, çünkü tüm konsantrasyonlardaki (% 0.005-0.4) stompun bitki hücrelerinde C-mitoza neden

olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar tarafından, fare kemik iliği hücrelerinde KA frekansı artışının, farelere stomp verilmesinin geç muamele sürelerinde (96 saat) meydana geldiğinden dolayı genotoksik metabolitlerin biyosentezi yoluyla olabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, fare kemik iliği hücrelerinde stomp tarafından oluşan MN'ların muhtemelen bu maddenin klastojenik etkisinden kaynaklanmış olduğunu ve bu sonucun, fare kemik iliği hücrelerinde MN'lu PCE (polikromatik eritrosit) ve KA frekansı arasındaki tutarlı sonuçlar ile desteklendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, çalışmada bazı pestisidlerin bitki ve hayvan hücrelerinde farklı sonuçlar oluşturabileceği ve bu farklılıkların metabolizma ve mitotik iğ ipliği bozunumu üzerine etkilerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Ayrıca, trifluralinin genotoksik etkisi fare kemik iliği hücrelerinde MN testine göre araştırılmıştır. Araştırmacılar, 1.400 mg/kg b.w. konsantrasyonundaki trifluralin uygulamasının sadece dişi farelerin kemik iliği hücrelerindeki MN sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığını bildirmişlerdir.

Sinha ve ark. (1998) Fluchloralinin memeli hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre edilmiş Chinese hamsteri ovaryum (CHO) hücrelerine 2.5, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarındaki fluchloralinin 8-12 saat uygulanmasının kromozom anormalliği taşıyan metafaz hücrelerinin frekansında önemli artış meydana getirdiğini; test maddesinin yüksek konsantrasyonlarında (10 ve 20 µg/ml), 12 saat muamelesinin ise kardeş kromatid değişimi frekansında da önemli derecede artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, CHO hücreleri 72 saat fluchloralin ile muamele edilince canlı hücre sayısında % 50 azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, fluchloralinin neden olduğu hücre ölümü mekanizmasını anlamak için test maddesinin DNA sentezine etkisini ve onun apoptosisi indüklemeye yeteneğini de çalışmışlardır. Araştırmacılar tarafından, fluchloralin ile oldukça kısa (6 saat) muamele edilen CHO hücrelerinde bile DNA sentezinin % 30-50 arasında azaldığı ve herbisit uygulanmış hücrelerden elde edilen DNA'nın agaroz-jel elektroforezi ve sitokimyasal boyaması ile fluchloralinin apoptosisi arttırdığının belirlendiğini bildirmişlerdir.

Várnagy ve ark. (2002) tarafından yapılan başka bir çalışmada % 20 benfluralin içeren flubalex, ROSS 308 embriyone tavuk yumurtalarına 12 gün boyunca uygulanmıştır. Test maddesi % 0.3 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış ve 0.1

ml/yumurta hacminde yumurtaların hava boşluğuna enjekte edilmiş veya yumurtalar daldırma tekniğiyle muamele edilmiştir. Embriyoların ölüm oranı, injeksiyon uygulamasına göre daldırma uygulamasından sonra önemli derecede daha fazla görülmüştür. Makro ve mikroskobik değişimler gözlenmemiştir.

Keseru ve ark. (2004)'nın yaptıkları çalışmada flubalex, % 0.375 benfluralin içeren konsantrasyonda tavuk yumurtalarına sadece bir defa uygulanmıştır. Uygulama yumurtanın hava boşluğuna (0.1 ml hacim/yumurta) injeksiyon şeklinde yapılmış veya yumurtalar daldırma tekniğiyle 37 °C'de 30 dk muamele edilmiştir. Değerlendirme inkübasyonun 19. gününde yapılmıştır. Araştırmacılar, çalışmalarının sonunda benfluralin uygulamasının embriyoların vücut ağırlığında önemli bir azalmaya neden olmadığını fakat embriyo ölüm oranının kontrole göre önemli derecede arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında test maddesinin injeksiyon şeklinde uygulamasının daldırma tekniğine göre daha toksik sonuçlar ortaya çıkardığını ileri sürmüşlerdir.

Kaya ve ark. (2004) tarafından, trifluralinin *Drosophila melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'ne göre genotoksik ve mutajenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Patel ve ark. (2007) tarafından pendimethalinin, kültüre edilmiş CHO hücrelerindeki genotoksik potansiyeli comet testine göre sitotoksitesisi ise MTT (3-4,5-Dimethyl thiazol-2—yl 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testine göre değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, farklı konsantrasyonlardaki pendimethalin ile 3 saat muamele edilen CHO hücrelerinde, MTT testine göre mitokondriyal aktivitenin kontrole kıyasla azaldığını ve bunun da test maddesinin sitotoksik olduğunun bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada, 1000 µM konsantrasyonundaki pendimethalinin CHO hücrelerindeki mitokondriyal aktiviteyi % 65'e kadar azalttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, ayrıca 0.1-100 µM konsantrasyon aralığındaki pendimethalinin CHO hücrelerine 3 saat uygulanması sonucunda, test maddesinin bu hücrelerde doza-bağlı olarak ve önemli derecede DNA hasarını arttırdığını ve bu nedenle genotoksik potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Könen ve Çavaş (2008), trifluralin ve onun ticari formülasyonu olan treflanın (etken madde olarak trifluralin içerir, 480 g/l) genotoksik etkilerini ticari olarak önemli bir balık türü olan *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia)'da MN testi kullanarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmaları sırasında, balıkları, laboratuvar

koşullarında 1, 5 ve 10 µg/l konsantrasyonlarındaki trifluralin ve treflan ile 3, 6 ve 9 gün maruz bırakmışlar (test konsantrasyonlarında 10 litre su içeren akvaryumda) ve MN değerlendirmesini balıkların periferal eritrositlerinde yapmışlardır. Araştırmacılar tarafından, hem treflanın hem de trifluralinin çalışılan tüm süre ve konsantrasyonlarda, *O. niloticus*'un periferal eritrositlerindeki MN frekansını istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, çalışmalarını sonucunda saf olarak kullanılan etken madde olan trifluralinin, ticari formülasyonu olan treflana göre balıklarda daha fazla genotoksik potansiyele sahip olduğunu belirlediğini bildirmişlerdir. Bunun sebebi olarak da muhtemelen saf haldeki trifluralinin balık vücuduna doğrudan penetrasyonunun (nüfuz edilmesi) olduğu ifade edilmiştir.

Fernandes ve ark. (2009), trifluralin herbisidinin *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerindeki kromozomal ve nükleer anormallikler üzerine etkisini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar *A. cepa* kök uçlarını farklı konsantrasyonlardaki trifluralin (0.42, 0.84, 1.67 ve 3.34 mg/l) ile 24 saat muamele etmişler daha sonra 48 saat geri dönüştürme uygulaması (recovery post-treatment) yapmışlardır. Araştırmacılar, 0.84 mg/l (24 saat muamele) ve 3.34 mg/l (24 saat muamele, daha sonra 48 saat geri dönüştürme uygulaması) konsantrasyonlarındaki trifluralinin kontrole göre MI'yi önemli derecede düşürdüklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, aynı konsantrasyonlarda, 24 saatlik uygulama ile bu uygulamanın ardından yapılan 48 saatlik geri dönüştürme uygulaması arasında MI bakımından önemli bir farklılık bulunmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, trifluralinin bazı konsantrasyonlarının kromozomal ve nükleer (C-metafaz, poliploidi, kromozom yapışması, multipolar anafaz, kalgın kromozom, kromozom kaybı, kromozom kırığı, köprü, çok nükleuslu hücreler, düzensiz nükleuslu hücreler gibi) bozuklukları arttırdığını belirlemişlerdir. Çalışmada, *A. cepa* kök uçlarındaki anormal hücrelerin total frekansına bakıldığında; 24 saatlik trifluralin uygulamasında tüm konsantrasyonlarda kontrole göre anormal hücre sayısında istatistiksel olarak önemli derecede artış meydana gelmekle birlikte en fazla anormallik görülen konsantrasyonların 0.42 ve 0.84 mg/l olduğu bildirilmiştir. 24 saatlik muameleden sonra, kök uçlarının 48 saat suda bekletilerek yapılan geri dönüştürme uygulamasında ise total anormal hücre frekansı, 0.42, 0.84 ve 1.67 mg/l trifluralin konsantrasyonlarında, kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği ve bu artışın 1,67 mg/l konsantrasyonunda 24 saatlik muameleye göre de istatistiksel olarak önemli olduğu

belirtilmiştir. Araştırmacılar, çalışmalarında, C-metafaz ve poliploid metafazların çok önemli frekanslarda bulunmasından dolayı, trifluralinin *A. cepa*'da mikrotübül polimerizasyonunu engelleyici bir rol oynayarak anojenik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Bozari ve Aksakal (2013), trifluralinin mısır (*Zea mays*) üzerindeki muhtemel genotoksik potansiyelini rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) tekniğini kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla, araştırmacılar tarafından mısır fideleri 0.5-3 ppm konsantrasyon aralığında trifluralin içeren solüsyonlar ile 7 gün boyunca muamele edilmiştir. Trifluralin uygulamasından sonra RAPD profillerinde kontrole göre önemli değişiklikler belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu değişikliklerin, kontrole göre normal bandların kaybolması veya yeni bandların görülmesi şeklinde olduğunu ve bu değişikliklerin konsantrasyona bağlı bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından ayrıca, trifluralin ile muamele edilen fidede, kök büyümesi, çözülebilir protein içeriğinin trifluralin konsantrasyonu arttıkça azaldığı bildirilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen, 23-24 yaşlarında 2 bayan ve 2 erkekten alınan periferik kan ve test maddesi olarak 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil bir sentetik bitki gelişim düzenleyicisi/herbisit olan flumetralin kullanılmıştır. Flumetralin (Fluka 45501, saflık:  $\geq 98.0$  %) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.

Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Mersin Üniversitesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (22/12/2011 tarih ve 2011/103 nolu karar).

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Flumetralin

Bu çalışmada, test maddesi olarak 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil bir sentetik bitki gelişim düzenleyicisi/herbisit olan flumetralin kullanılmıştır. Bu grup herbisitler kültür bitkilerinde, çimlenme öncesinde kullanılır. Bitki bünyesine geniş ölçüde çimlenen tohum, sürgün ve kökler tarafından alınır. Hassas bitkilerde büyümeyi ve sürgün vermeyi önlerler. Toprakta kalıcılıkları ortalama 4-8 aydır (Anonymous, 2014).

Dinitroanalinin herbisitleri, hassas bitkilerinin kök hücrelerindeki hücre bölünmesini inhibe ederek kök hücrelerinin normal büyümesini engeller ve bitkiyi öldürürler. Bu inhibisyon, kök sisteminin boyut ve fonksiyonunu ciddi anlamda sınırlayarak bitki dehidrasyonuna yol açar (Anonymous, 2014). Özellikle, mitoz sırasında hücre duvarları oluşumunda ve kardeş hücrelerde kromozom hareketi için gerekli mikrotübülün sentezini inhibe ederler. Böylece, herbisitten etkilenen hücreler, hücre bölünmesini tamamlayamadığından çok çekirdekli hücre oluşumuna neden olurlar (Anonymous, 2014).

Dinitroaniline herbisitleri, bitki kök sistemleri tarafından tarafından büyük ölçüde emilir. Bu herbisit grubu çok lipofiliktir (yağ seven). Kök ve sürgünlerinin yüksek lipid alanlarında konsantre olma eğilimindedirler ve bu bölgelerde toksik etkilerini gösterirler (Anonymous, 2014). Bunlar biyolojik sistemlerdeki asitleri ( $\text{HNO}_2$ ) metabolize ederler. Kromozomlarda, nükleotid bazlarının amino gruplarını

çıkarttıkları için (deaminasyon) kanserojen olarak kabul edilmişlerdir. Ayrıca toksik alkilleyici ajanlar olarak da etki edebilirler (Anonymous, 2014).

Flumetralin, 1983 yılından itibaren sadece tütünde kullanım için tescil edilmiştir. Şu anda bu durumda aktif altı kayıt bulunmaktadır. Kayıtları Syngenta Crop Protection, Inc, Drexel Chemical Co ve SRM Kimyasal LTD tarafından yapılmaktadır.

Flumetralin, tütün bitkisinde yan tomurcuğun büyümesini kontrol etmek amacıyla kullanılmakta ve sprey olarak uygulanmaktadır. Flumetralin uygulandıktan sonra, birkaç saat içinde tütün bitkisi tarafından emilmekte ve büyüme dönemi boyunca yan tomurcukların büyüme kontrolünü sağlamaktadır. Flumetralin büyüme dönemi boyunca yalnızca bir kez; tütün bitkilerinin çiçek kısımları çıktıktan sonra 3 ile 7 gün arasında uygulanmaktadır.

Flumetralinin tütün bitkilerinde bitki büyüme düzenleyicisi olarak kullanımı dışında kayıtlı bir kullanım kaydı bulunmamaktadır (USEPA, 2007).

Flumetralin yalnızca ticari tütün bitkilerinde uygulanan kimyasal olarak kabul edilmektedir. Çalışanlar iş ortamında flumetraline maruz kalabilirler. Bununla birlikte; flumetralin tütün bitkileri için açık havada kullanıldığından içme suyu kaynaklarına karışma riski taşımaktadır. Mesleki maruziyet dışında tütün ürünlerinin kullanımı da flumetraline maruz kalma riski taşımaktadır (USEPA, 2007).

Flumetralin düşük bir akut toksisite profili vardır. Bu etki; deride hafif bir tahriş ve dermal hassasiyet şeklinde olabilmektedir (USEPA, 2007).

## **3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

### **3.2.1. Flumetralin (Sigma-Aldrich)**

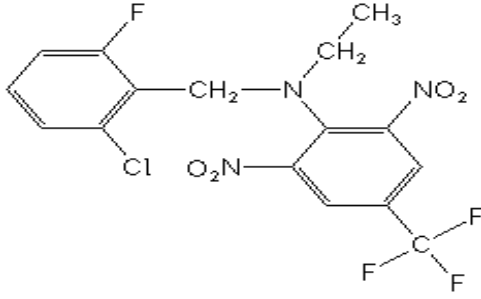
**Kimyasal adı (IUPAC):** N-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-N-ethyl-2,6-dinitro-4(trifluoromethyl)aniline

**CAS Adı:** 2-chloro-N-[2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-N-ethyl-6 fluorobenzenemethanamine

**Ticari Adı:** Prime<sup>+</sup>, Flupro, Drexalin Plus

**Kapalı formülü:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>ClF<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**Açık formülü:**



**Molekül ağırlığı:** 421.74 mol

**Erime noktası:** 101-103 °C

**CAS No:**62924-70-3

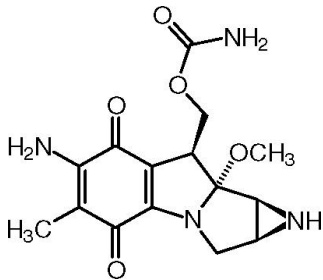
### 3.2.2. Mitomycin C (MMC) (Sigma)

Mitomycin C bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Kimyasal adı:** Mitomycin C

**Kapalı formülü:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Açık formülü:**



**Molekül ağırlığı:** 334.327 g/mol

**Erime noktası:** 360 °C

**CAS No:**50-07-7

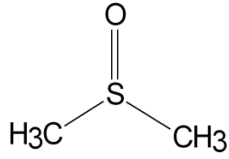
### 3.2.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma)

DMSO, bu çalışmada flumetralinin çözücüsü olarak kullanılmıştır.

**Kimyasal adı:** Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

**Kapalı formülü:** C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO ya da (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

**Açık formülü:**



**Molekül ağırlığı:** 78.13

**Kaynama noktası:** 189 °C

**Erime noktası:** 18.4-190 °C

**Saflık düzeyi:** ≥99.9

**CAS No:** 67-68-5

**Sigma No:** 8418

### **3.2.4. Kromozom Medyumu**

Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat No. F 5023), hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır:

#### **MEM JOKLIK with**

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| Non essential Amino Acids..... | 850 ml   |
| Heparin.....                   | 25.000 E |
| Penicillin G, Sodium Salt..... | 75.000 E |
| Sterptomycin Sulphate.....     | 50 mg    |
| Phytohemagglutinin L.....      | 2.5 mg   |

Bu medyum her tüpe 2.5 ml olacak şekilde steril kültür tüplerine steril şartlarda paylaştırılmış ve bu şekilde kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

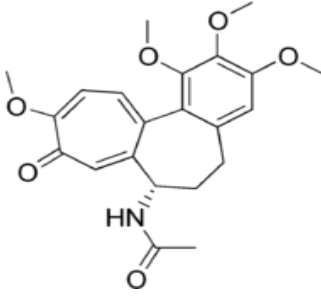
### **3.2.5. Kolkisin (Sigma)**

Kolkisin (Colchicine), preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolkisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolkisine ait özellikler aşağıda verilmiştir.

**Kimyasal adı:** Colchicine

**Kapalı formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>

### Açık formülü:



**Molekül ağırlığı:** 399.4

**Etil asetat içeriği:** % 3.4

**Kloroform içeriği:** < % 0.1

**Sigma No:** C-9754

### 3.2.6. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCl (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanan eriyik, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+ 4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik, 37 °C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

### 3.2.7. Fiksatif

KA deneylerinde 1 hacim asetik asit'in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır.

MN deneyleri için birinci fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol ve 6 hacim % 0.9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/% 0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise; 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

### 3.2.8. Sorensen Tamponu

Bu eriyik, Sorensen Tamponu A ve Sorensen Tamponu B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

**Sorensen Tamponu A:** 11.34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 ml saf su içerisinde eritilmiştir. (pH = 4.8)

**Sorensen Tamponu B:** 14.83 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  50 ml saf su içerisinde eritilmiştir. (pH = 9.3).

### 3.2.9. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış % 5'lik boya eriyiği kromozomları ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

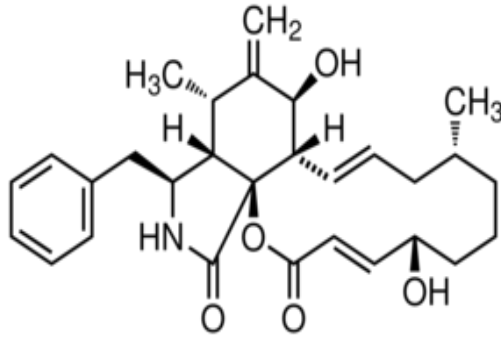
### 3.2.10. . Sitokalsin B (Cytochalasin B)

Mikronükleus testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

**Kimyasal adı:** Cytochalasin B

**Kapalı formülü:**  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_5$

**Açık formülü:**



**Molekül ağırlığı:** 479.62 g/mol

**Erime noktası:** 221-223 °C

**Kaynama noktası:** 221-223 °C

**Safılık düzeyi:** %98

**CAS No:** 14930-96-2

**Sigma No:** C-6762

## 3.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

### 3.3.1. Santrifüj

Çalışmalarda rotor çapı 18 cm, 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli HETTICH ROTOFIX 32A marka santrifüj kullanılmıştır.

### **3.3.2. Mikroskop**

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan NIKON marka, E 100 model ışık mikroskobu preparatları incelemek için kullanılmıştır.

### **3.3.3. İnkübatör**

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin ısıtılmasında ELECTRO-MAG M6040 BP marka 0–90 °C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

### **3.3.4. Flow Kabin (Steril Kabin)**

Hücre kültürü tüplerine kan ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, ELICENT marka, sürgülü cam kapaklı, UV lambalı ve hava filtresi olan steril kabin kullanılmıştır.

### **3.4. Lamların Temizlenmesi**

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce lamlar dik şaleye dizilerek lamların üzeri iyice örtülecek şekilde 1 N HNO<sub>3</sub> çözeltisi ile doldurulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar, 30 dakika boyunca akan musluk suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

### **3.5. Yöntem**

#### **3.5.1. Kromozom Anormalliklerini (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması**

##### **Bireylerin Seçimi**

Çalışmaya katılacak bireyler seçilirken standart anket formları kullanılmıştır. Anket çalışması aracılığıyla; bireylerin yaşam tarzı ve sağlık durumlarıyla ilgili bilgiler elde edilmiştir. 25 yaşın üzerinde olanlar, kronik veya genetik hastalığı olanlar, son üç ay içerisinde ciddi bir rahatsızlık geçirenler, flumetralin gibi genotoksik olması muhtemel çeşitli ajanlara mesleki ve çevresel olarak yüksek oranda maruz kalmış kişiler deney grubuna dahil edilmemiştir.

### **Kan Örneklerinin Alınması**

Her bireyden steril plastik enjektörler aracılığıyla 5 ml intravenöz kan örneği alınmıştır. Alınan kan örnekleri 1/10 (0,2 ml) oranında heparinize edilmiştir. Etiketlenen enjektörler, içerisinde kuru buz kalıpları bulunan çanta ile Mustafa Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Laboratuvarına getirilmiş ve hemen kullanılmıştır.

#### **3.5.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Sağlıklı ve sigara içmeyen iki bayan (24-25 yaşlarında) ve iki erkekten (24-25 yaşlarında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0.2 ml) steril şartlarda 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Hücre kültürü  $37\pm 1$  °C'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Flumetralinin etkisini incelemek için 125, 250, 500, 1000 µg/ml flumetralin, kültür bitiminden 24 ve 48 saat önce kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş birer çözücü kontrolü yapılmıştır. Eritici kontrolde, her kültür tüpüne son konsantrasyonu 8 µl/ml olacak şekilde DMSO ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden 35 µl (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır.

Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan hücreleri içeren 0.5-0.7ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'ye kadar ısıtılmış olan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi hücrelerde kümeleşmeyi engellemek için damla damla ve karıştırılarak yapılmış ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra ağzı kapatılan tüpler inkübatöre konmuştur. Hücreler 37 °C' de 13 dk. boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilmiştir. Sürenin sonunda hücre süspansiyonu santrifüj edildikten (1200 rpm'de 15 dk.) sonra süpernatant atılmıştır. Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırılarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif (1/3 glasiyal asetik asit:metanol) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santirfüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Üçüncü

fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Son santrifüjden sonra dipte 0.5- 0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir. Tüpün dibinde kalan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve içine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine 100 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır.

Bu şekilde hazırlanan preparatların 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek kurumaları sağlanmıştır.

### **3.5.1. 2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması**

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzümüştür. Preparatlar 25 dk. boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmış ve 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile içerisinde hava kalmayacak şekilde lamelle kapatılarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve böylece daimi hale getirilmiştir.

## **3.6. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar NIKON marka Eclipse E100 model ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10X100=1000 büyütme). Bu incelemeler sırasında kromozomal anormallikler belirlenmiş ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

### **3.6.1. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

#### **3.6.1.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması**

KA'ni belirlemek için her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış

kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400) incelenmiştir. İnceleme sırasında, bu hücrelerde gözlenen kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kromatid değişimi, disentrik kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, halka kromozom gibi yapısal (kromozom tipi ve kromatid tipi anormallikler) ve sayısal kromozom anormallikleri Paz-y-Miño ve ark. (2002)'na göre kaydedilmiştir. Bu incelemeler sonucunda saptanan kromozom aberasyonları kromatid tipi anormallikler, kromozom tipi anormallikler ve kromozom sayısı anormallikleri olmak üzere üç grup içerisinde değerlendirilmiştir. Kromatid tipi anormallikler kromatid kırığı, kromatid değişimi ve kardeş kromatid birleşmesi gibi anormallikleri içermektedir. Kromozom tipi anormallikler içerisinde ise kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom ve halka kromozomları yer almaktadır. Kromozom sayı anormalliklerini ise poliploidi ve endoreduplikasyon oluşturmaktadır. Saptanmış olan kromozom aberasyonlarından hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği, hücre başına düşen toplam kromozom anormalliği ve kromozom aberasyonu içeren anormal hücre yüzdesi hesaplanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Preston ve ark. (1987)'na uygun olarak şu şekilde ayırt edilmiştir: Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge, bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. Gap ile kromatid veya kromozom kırıkları, bu ölçülere göre birbirinden ayırt edilmiştir.

### **3.6.1.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

Flumetralinin mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'yi belirlemek için her kişinin her konsantrasyonuna ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

### **3.7. Mikronükleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması**

#### **3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

In vitro mikronükleus testinde Fenech (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yönetime göre, sağlıklı insanlardan alınan periferik kanın 0.2 ml'si, 2.5 ml kromozom medyumuna ekilmiş ve hücreler  $37\pm 1$  °C'de 68 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan maddenin etkisini belirlemek için 125, 250, 500, 1000 µg/ml konsantrasyonlarındaki flumetralin kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü ve bir çözücü kontrolü yapılmıştır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücreler hipotonik eriyikle (% 0.4 KCl)  $37\pm 1$  °C 'de 5 dakika muamele edilmiştir. Hipotonik eriyik, kültüre yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ile muamelenin ardından kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6= glasiyal asetik asit/metanol/% 0.9 NaCl) ile muamele edilmiştir. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 15 dakika muameleden sonra 1200 rpm'de 10 dk. daha santrifüjlenen tüplere glasiyal asetik asit/metanol (1/5) ilavesi yapılarak 10 dakika oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır. Sonra 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj yapılarak süpernatant atılmış tüplere glasiyal asetik asit/metanol (1/5) ilavesi yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak tüpler 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış fiksatif kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Lenfosit yayılmış preparatlar kurumaya bırakılmıştır.

#### **3.7.2. Preparatların Boyanması**

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış % 5'lik Giemsa boyası ile 20-25 dk. boyanmış ve üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak

incelemeye hazır hale getirilmiştir.

### **3.8. Mikronükleus Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme**

Hazırlanan daimi preparatlar NIKON marka, Eclipse E100 model ışık mikroskopunda 10 X 40=400 büyütmede incelenmiştir.

#### **3.8.1. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması**

Mikronükleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binüklear) toplam 1000 hücre (Şekil 3.2) incelenmiş ve bu binüklear hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin toplam hücre sayısına oranlanması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle ise hücre başına düşen mikronükleus sayısı (MN/hücre) hesaplanmıştır. Bundan da MN %'si belirlenmiştir.

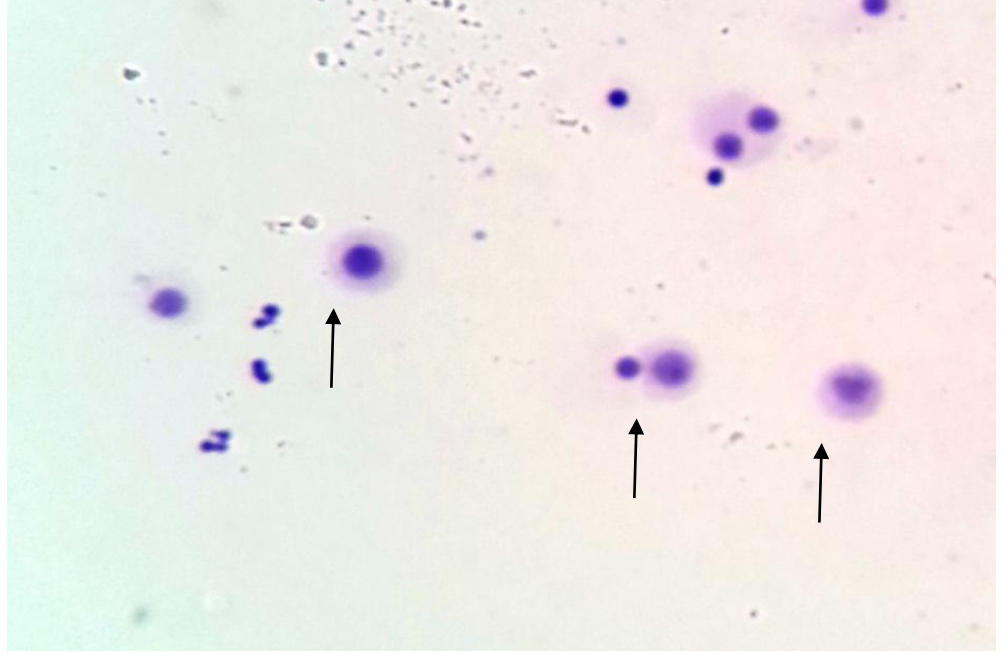
Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır: (1) Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır; (2) Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır; (3) İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir; (4) MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır; (5) MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır; (6) MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu durum, sitokinasin B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nükleus bölünme indeksi (NBI) Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

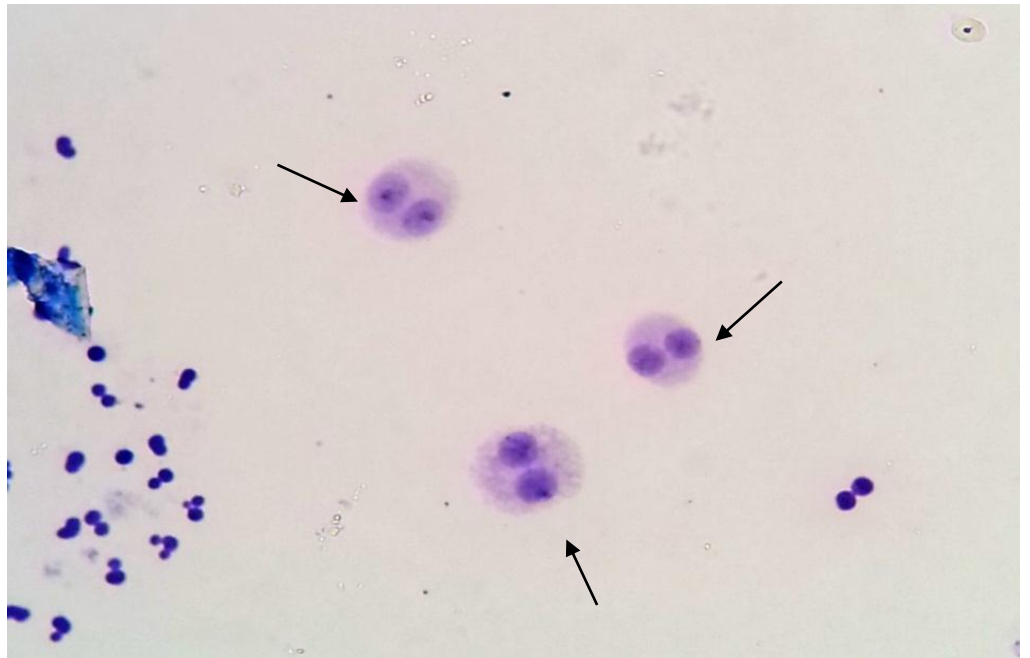
$$NBI = (MI + 2MII + 3 MIII + 4 MIV) / N$$

Formüle göre, MI bir nükleuslu (Şekil 3.1), MII iki nükleuslu (Şekil 3.2), MIII üç nükleuslu (Şekil 3.3), MIV dört nükleuslu (Şekil 3.4) hücrelerin sayısını, N ise

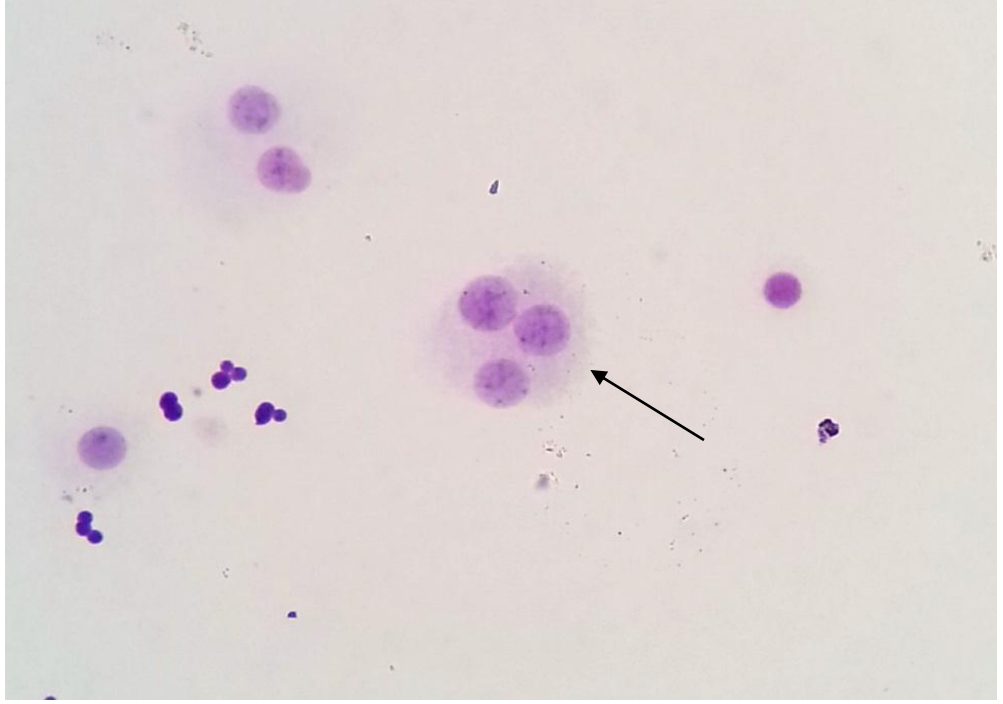
toplam hücre sayısını göstermektedir. NBI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. NBI için her preparatta toplam 1000 hücre (4 kişi 4000 hücre) sayılmıştır.



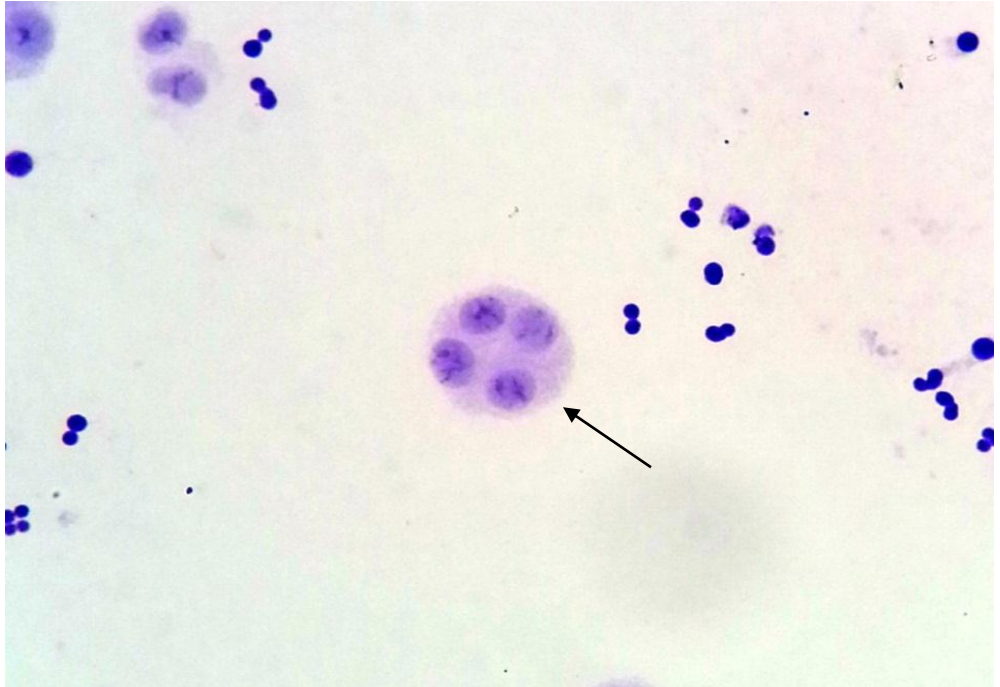
Şekil 3.1. Bir nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.2. İki nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.3. Üç nükleuslu hücre (x1000).



Şekil 3.4. Dört nükleuslu hücre (x1000).

### 3.9. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi

Fotoğraf çekme işlemi NIKON marka, Eclipse E200 model trinoküler mikroskoba monte edilen ve Yrd. Doç. Dr. Selahattin KOCAMAN (MKÜ Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü) tarafından tasarlanan bir aparat yardımıyla, 8 Megapiksel çözünürlüğe sahip Samsung Note II N7100 marka telefon kullanılarak 1000 büyütmede yapılmıştır (Şekil 3.5).

Mitoz bölünme geçiren hücrelerin incelenmesi sırasında rastlanan bazı ilginç kromozom anormalliklerinin ve mikronükleuslu binükleer hücreler ile 1, 2, 3, 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.5. Mikroskopta fotoğraf çekimi (Güven, B., 2014'den alınmıştır).

### 3.10. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 11.5 for Windows kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar  $P < 0.05$  anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Muameleli

ve kontrol kültürlerdeki ortalama KA'li hücre oranları, KA/hücre sayıları, MI, mikronükleuslu binükleer hücre sayısı (MNBN), hücre başına düşen mikronükleus sayısı (mikronükleus/hücre) ve NBI arasındaki farkın önemli olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc analiz-LSD Test, Least Significant Difference) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, konsantrasyon-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı ( $r$ ) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Flumetralinin İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Genotoksik Etkileri

#### 4.1.1. Flumetralinin Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlardaki flumetralin ile 24 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre %'si, anormal hücre %'si, ve hücre başına düşen toplam KA (toplam KA/hücre), hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır (Çizelge 4.1). Flumetralin ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde ise, yapısal KA taşıyan hücre %'si, anormal hücre %'si ve toplam KA/hücre oranının 250 µg/ml'lik konsantrasyonda sadece negatif kontrole göre en yüksek olan diğer iki konsantrasyonda (500 ve 1000 µg/ml) hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bununla birlikte, flumetralin KA'ni pozitif kontrol (MMC) kadar uyardırmıştır. Yapısal KA taşıyan hücre %'si, anormal hücre %'si ve toplam KA/hücre oranı tüm süre ve konsantrasyonlarda pozitif kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur.

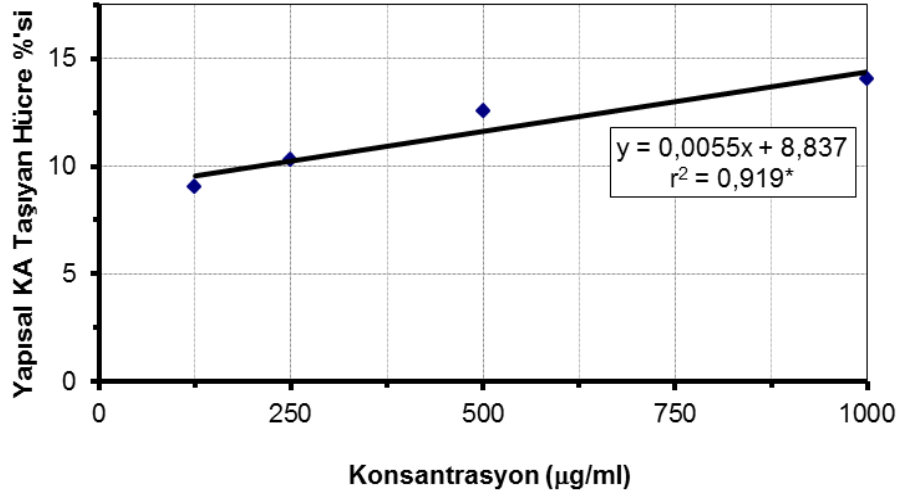
Flumetralin ile 48 saat muamele edilen kültürlerde yapısal KA taşıyan hücre %'si ( $r^2=0.919$ ,  $P<0.05$ ) ve anormal hücre %'si ( $r^2=0.900$ ,  $P<0.05$ ) istatistiksel olarak önemli bir şekilde konsantrasyona bağlı artış gösterirken (Şekil 4.1, Şekil 4.2); aynı parametreler için 24 saatlik muamelede konsantrasyon-etki ilişkisi görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Ayrıca, flumetralinle muamele edilen kültürlerde, total KA/hücre oranı bakımından konsantrasyon-etki ilişkisi hem 24 hem de 48 saatlik muamelede önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ).

Flumetralin, insan periferal kan lenfositlerinde kromatid kırığı (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5), kromozom kırığı (Şekil 4.6), kromozomal fragment (Şekil 4.7), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10), disentrik kromozom (Şekil 4.11) ve kromatid değişimi (Şekil 4.12, Şekil 4.13) gibi yapısal kromozom anormalliklerine ve az da olsa poliploidi (Şekil 4.14) ve endoreduplikasyon (Şekil 4.15) gibi sayısal kromozom anormalliklerine neden olmuştur.

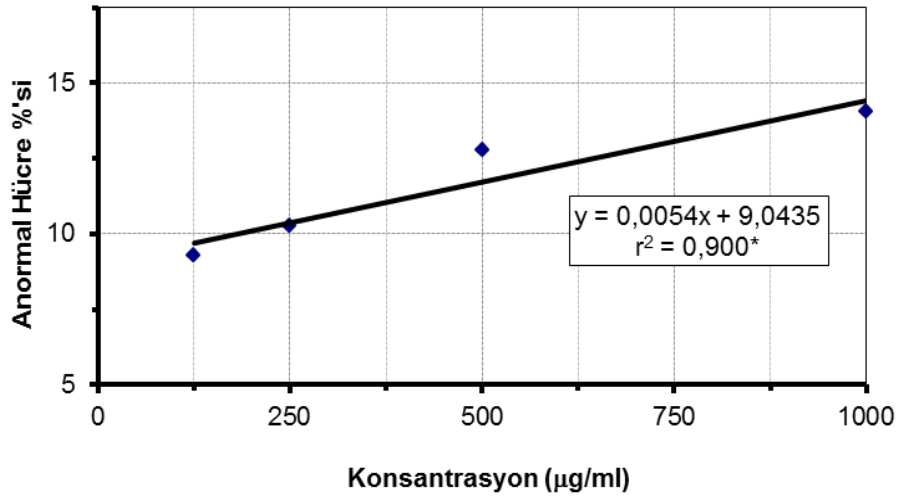
**Çizelge 4.1.** Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde kromozom anormallikleri.

| Test Maddesi    | Muamele     |               | [Belgeden bir alıntı veya ilginç bir noktanın özetini yazın. Metin kutusunu belgede istediğiniz yere yerleştirebilirsiniz. Kısa alıntı metin kutusunun biçimlendirmesini değiştirmek için Çizim Araçları sekmesini kullanın.] |     |   |  | Normal Hücre %'si ± SH                                   | Toplam KA/Hücre ± SH                                    |
|-----------------|-------------|---------------|---|-----|---|--|--|---|
|                 | Süre (saat) | Kons. (µg/ml) |   |     |   |  |  |   |
| Negatif Kontrol | --          | --            |   |     |   |  | ±0.95  | 0.06 ±0.01  |
| DMSO (ÇK)       | 24          | 8 µl/ml       | 18  | 6   | 0 | 6.00 ±0.81   | 6.00 ±0.81   | 0.06 ± 0.01   |
| MMC (PK)        | 24          | 0.20          | 77  | 62  | 4 | 29.25±3.86 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 | 30.25±3.77 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 | 0.35±0.05 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 |
| Flumetralin     | 24          | 125           | 12  | 17  | 0 | 6.50 ±0.57 c <sub>3</sub>                                | 6.50 ±0.57 c <sub>3</sub>                                | 0.07 ±0.01 c <sub>3</sub>                               |
|                 |             | 250           | 20  | 17  | 0 | 8.75 ±0.95 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>  | 8.75 ±0.95 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>  | 0.09 ±0.01 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub> |
|                 |             | 500           | 20  | 17  | 1 | 8.50 ±1.29 a <sub>2</sub> c <sub>3</sub>                 | 8.75 ±0.95 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>  | 0.10 ±0.02 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub> |
|                 |             | 1000          | 31  | 13  | 0 | 10.50 ±1.91 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 10.50 ±1.91 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 0.11 ±0.01 a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> |
| DMSO (ÇK)       | 48          | 8 µl/ml       | 24  | 6   | 0 | 7.25 ±1.25   | 7.25 ±1.25   | 0.08 ±0.01  |
| MMC (PK)        | 48          | 0.20          | 155   | 116 | 2 | 49.25±6.60 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 | 49.75±6.39 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 | 0.68±0.09 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                 |
| Flumetralin     | 48          | 125           | 25  | 16  | 1 | 9.00 ±2.16 c <sub>3</sub>                                | 9.25 ±1.89 c <sub>3</sub>                                | 0.11 ±0.02 c <sub>3</sub>                               |
|                 |             | 250           | 27  | 17  | 0 | 10.25 ±1.50 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>                | 10.25 ±1.50 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>                | 0.11 ±0.01 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>                |
|                 |             | 500           | 36  | 19  | 1 | 12.50 ±1.73 a <sub>3</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub> | 12.75 ±2.06 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 0.14 ±0.03 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub> |
|                 |             | 1000          | 47  | 13  | 0 | 14.00 ±0.81 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 14.00 ±0.81 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 0.15 ±0.01 a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> |

a: Kontrol ile; b:Çözücü kontrol ile, c: pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.  
a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P≤0.05 a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P≤0.01 a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P≤0.001



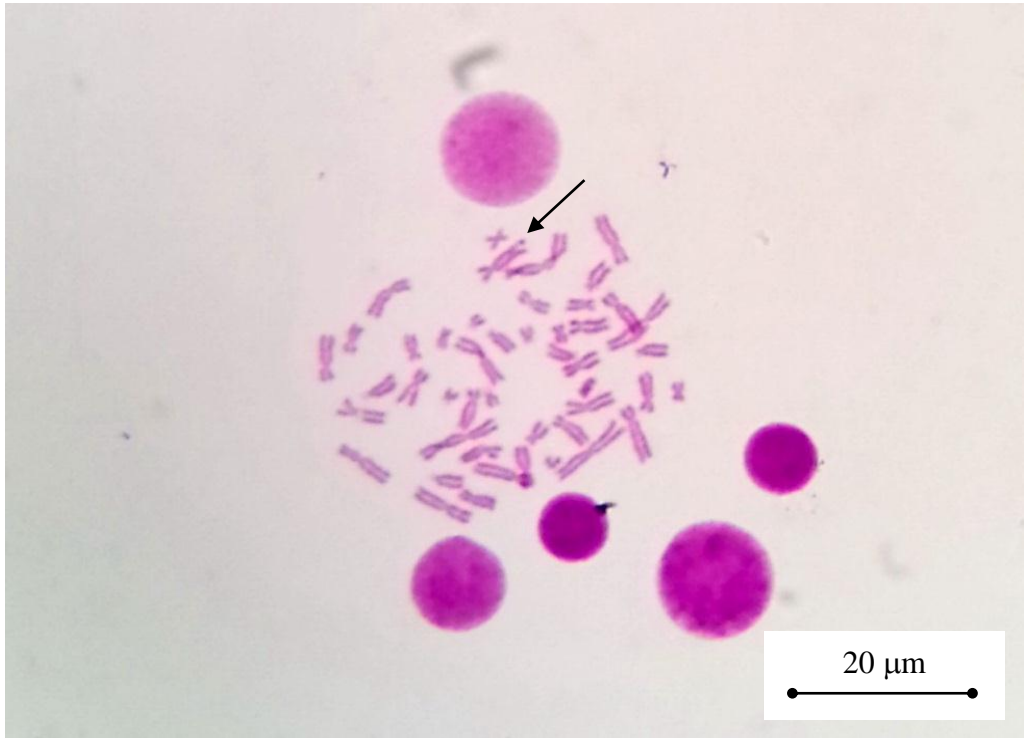
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda Flumetralin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.\*: P<0.05



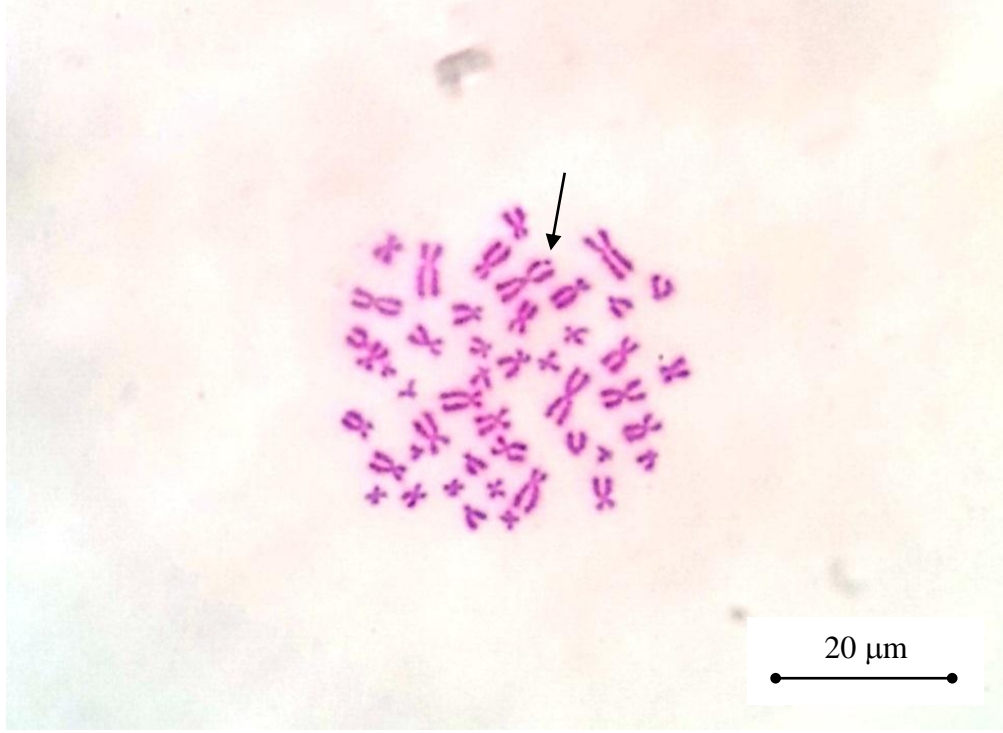
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda Flumetralin ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Anormal Hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.\*: P<0.05



Şekil 4.3. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (250 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.4. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♂) x1000.



Şekil 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı(250 µg/mlFlumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.6. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (1000 µg/mlFlumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



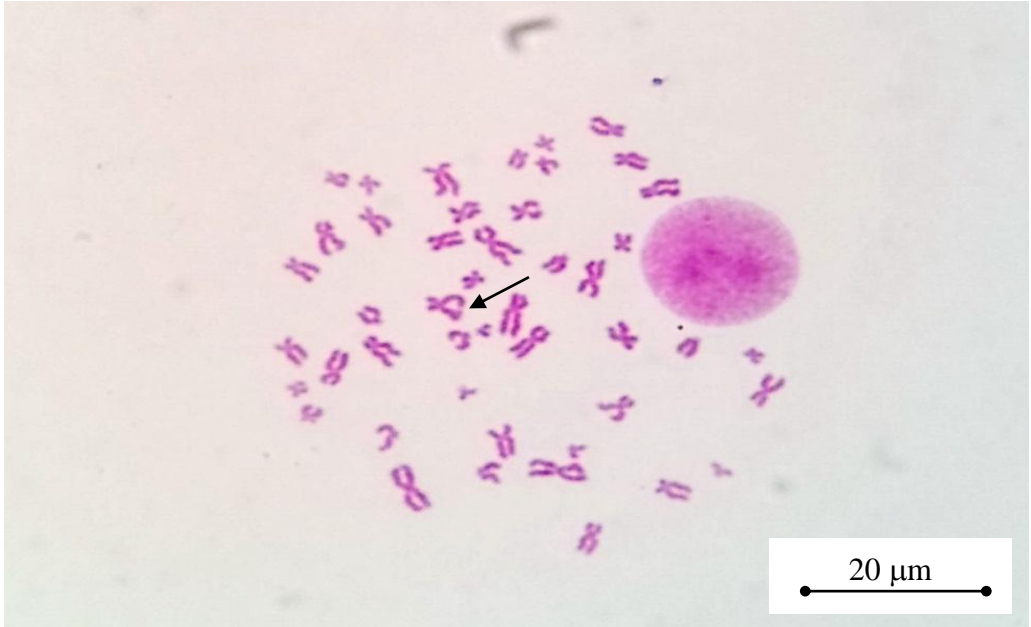
Şekil 4.7. Kromozom fragmenti (F) bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♂) x1000 .



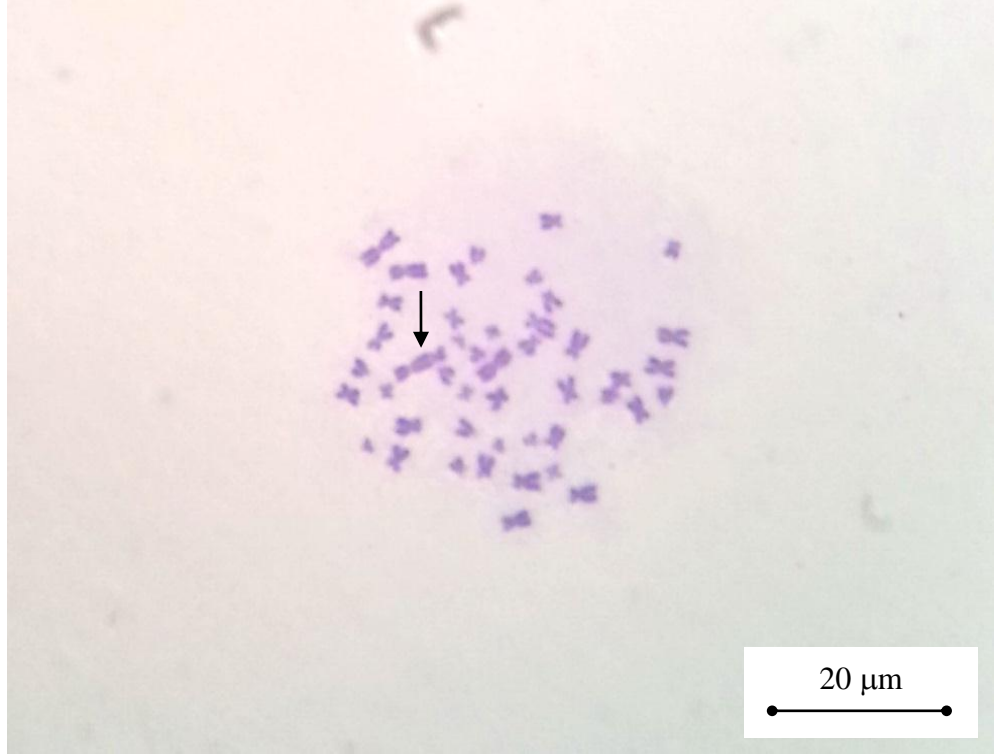
Şekil 4.8. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (125 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.9. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (125 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000.



Şekil 4.10. Kardeş kromatid birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı(125 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



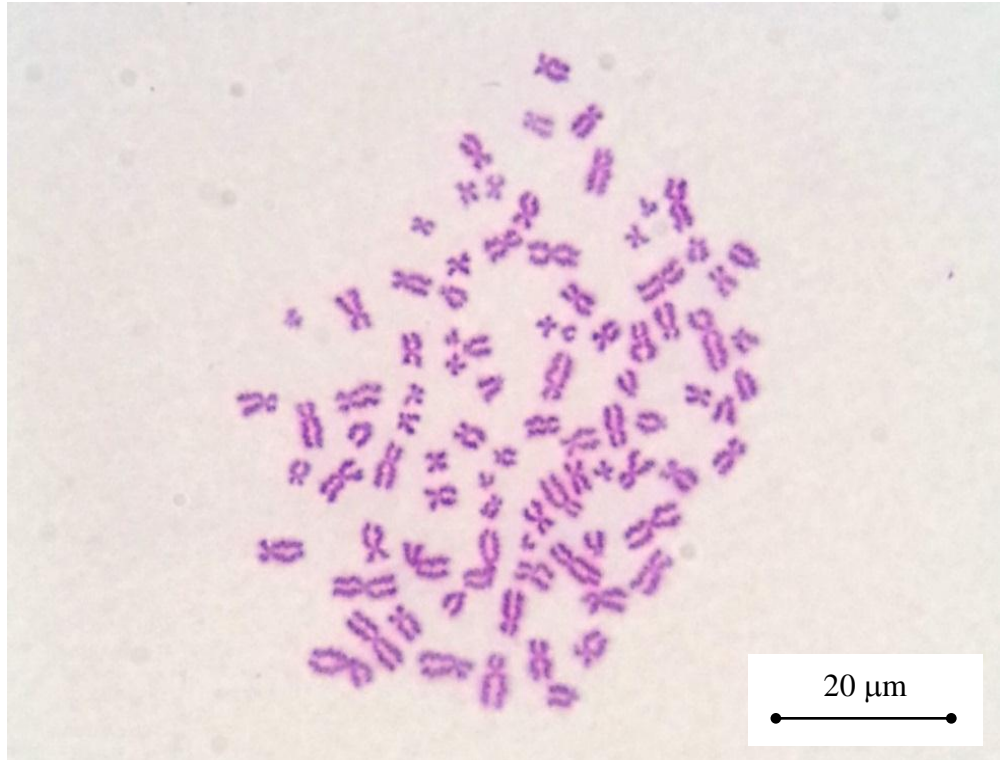
Şekil 4.11. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (1000  $\mu\text{g/ml}$  Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.



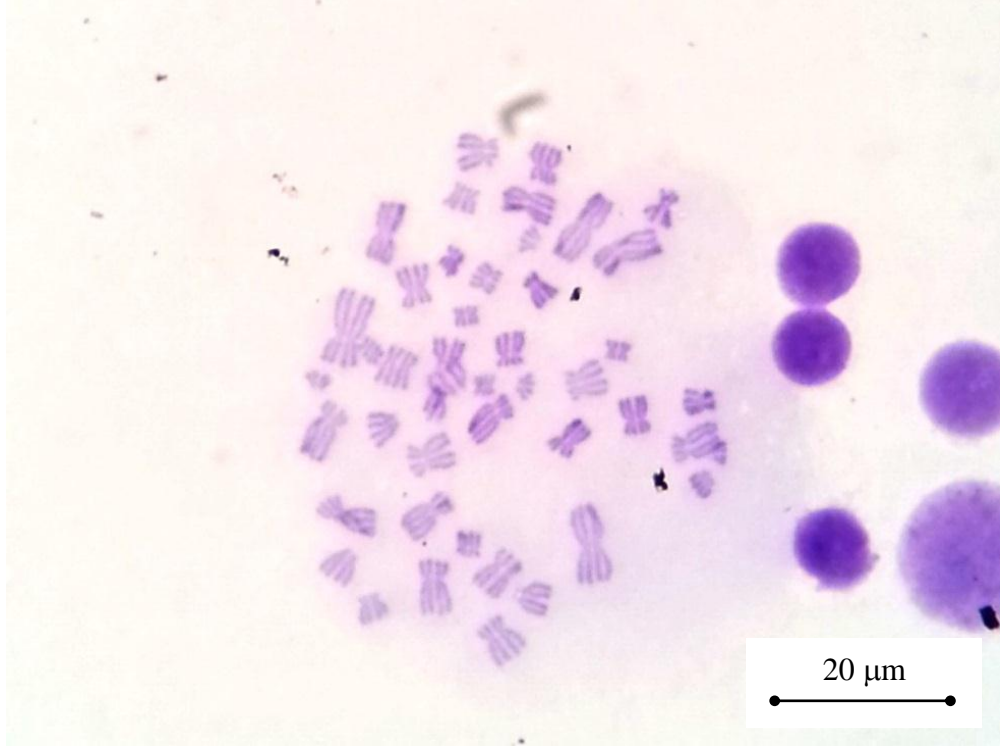
Şekil 4.12. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (1000  $\mu\text{g/ml}$  Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.13. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı(1000 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muam ele, ♀) x1000.



Şekil 4.14. Poliploidili (P) metafaz plağı (500 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.15. Endoreduplikasyonlu (E) metafaz plağı (125 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♀) x1000.

Bu çalışmada, 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil olan ve herbisidal aktiviteye de sahip bir bitki büyüme düzenleyicisi olan flumetralinin insan periferel kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Literatür araştırmamıza göre flumetralinin genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan başka herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma sonucunda elde edilen veriler fluchloralin, trifluralin, pendimethalin gibi 2,6-dinitroanilin sınıfına ait olan başka herbisitlerle yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde Ghiazza ve ark. (1984) tarafından trifluralinin kültüre alınmış insan periferel kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansını önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. KKD testi, çalışmamızda kullandığımız KA testi gibi çeşitli kimyasalların genotoksik hasarını belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan kısa süreli genotoksisite testlerinden biridir.

Panneerselvam ve ark. (1995) tarafından fluchloralinin genotoksik potansiyelini belirlemek için kültüre edilmiş insan lenfositlerinde KA testi yapılmıştır. Araştırmacılar, 2.5, 5.0 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarındaki fluchloralinin insan periferel kan lenfositlerine 24 ve 48 saat muamele edilmesinin bu hücrelerde kromatid tipi anormallik

sayısını istatistiksel olarak önemli derecede ve konsantrasyona bağı olarak arttırdığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda flumetralinin aynı etkiyi daha yüksek konsantrasyonlarda göstermiş olması maddelerin kimyasal farklılıklarından kaynaklanabilir. Fakat, Çizelge 4.1’de görüleceği gibi flumetralin de insan lenfositlerinde sayısal anormalliklere neden olan anöjenik etkiye nazaran daha çok klastojenik aktivite göstererek özellikle kromatid tipi yapısal anormalliklere neden olmuştur.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına uygun olarak, Ribas ve ark. (1995) tarafından trifluralinin (5-100 µg/ml) insan periferal kan lenfositlerinde genotoksik hasara neden olduğu tek hücre jel elektrofezi (single-gel electrophoresis) yani comet testi yapılarak belirlenmiştir. Sinha ve ark. (1998) tarafından da fluchloralin herbisidinin (2.5-20 µg/ml) kültüre edilmiş Chinese hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde klastojenik ve DNA hasarı oluşturan etkiye sahip olduğu KA ve KKD testleri kullanılarak bulunmuştur.

Dimitrov ve ark. (2006) tarafından, 2,6 dinitroanilin grubuna giren başka bir herbisit olan pendimethalinin ticari formülasyonu olan stompun fare kemik iliği hücrelerindeki genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. Araştırmacılar, etken maddesi pendimethalin olan stomp herbisidinin 489 mg/kg bw. konsantrasyonunda fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal anormallikleri önemli derecede arttırdığını bildirmişlerdir. Pendimethalinin genotoksik potansiyelini gösteren başka bir çalışma ise Patel ve ark. (2007) tarafından kültüre edilmiş CHO hücrelerinde comet testi kullanılarak yapılmıştır. Araştırmacılar, 0.1 µM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki pendimethalinin kültüre edilmiş CHO hücrelerinde DNA hasarını istatistiksel olarak önemli derecede arttırarak genotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Fernandes ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada da trifluralin herbisidinin *Allium cepa* L. kök ucu meristem hücrelerinde kromozomal ve nükleer anormallikleri arttırdığı bildirilmiştir.

Literatür araştırmamıza göre, bizim çalışmamızın sonuçlarına uygun olarak, 2,6 dinitroanilin grubuna giren herbisitlerin, değişik hücre hattı ve farklı testlerde genel olarak genotoksik potansiyele sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, bizim ve yukarıda bahsettiğimiz çalışmaların aksine birkaç çalışmada söz konusu herbisitler için

negatif sonuçlar da bildirilmiştir (Pilinskaia, 1987; Garriott ve ark., 1991; Ribas ve ark., 1996).

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre; insan periferik kan lenfositlerine 24 ve 48 saat süre ile muamele edilen 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarındaki flumetralinin yapısal KA'yı negatif kontrol ve çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de görülebileceği gibi, test maddemiz olan flumetralin, insan lenfositlerinde sayısal kromozomal anormalliklerinden ziyade özellikle kromatid tipi olmak üzere yapısal kromozomal anormalliklerin artışına neden olmuştur. Bu durum, bizim test koşullarımızda, flumetralinin sayısal anormalliklere neden olan anöjenik etki göstermeyip, kromozomlarda meydana gelen kırıklar ve yeniden düzenlenmeler sonucu oluşan yapısal anormalliklere neden olan klastojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Böylece, flumetralinin doğrudan ya da serbest radikal üretimi gibi yollarla dolaylı olarak DNA'nın fosfodiester bağını kırarak yapısal KA artışına neden olduğunu ve klastojenik etki yaptığını söyleyebiliriz.

Flumetralin kimyasal yapı olarak 2,6-dinitroanilin grubu bileşiklerdendir. Bir fenil halkasının 2. ve 6. pozisyonlarında olmak üzere 2 nitro (NO<sub>2</sub>) grubuna sahiptirler. Dinitroanilinler, mikrotübül-depolimerize edici kimyasallar olarak karakterize edilirler ve bazılarının (oryzalin, trifluralin) bitki tübülündeki antimikrotübül etkileri çok iyi bir şekilde ortaya konulmuştur (Morejohn ve ark., 1987; Morejohn ve Fosket, 1991; Antony ve Hussey, 1999). Bu yüzden, bu grup kimyasalların bitkilerde kolşisin benzeri anojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Morejohn ve Fosket, 1986). Bununla birlikte, dinitroanilinlerin seçici bir şekilde bitki ve protozoa mikrotübüllerini inhibe ettiği fakat fungal ve omurgalılarıdaki mikrotübüllere etki edemediği bildirilmiştir (Morejohn ve Fosket, 1986; Morissette ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda da KA testi sonuçlarını analiz ettiğimizde flumetralinin sayısal KA'yı arttırmadığı fakat yapısal KA sayısını kontrole (negatif ve çözücü kontrol) göre önemli derecede arttırdığını görmekteyiz. Bu nedenle, flumetralinin insan lenfositlerinde esas olarak klastojenik etki gösterdiğini belirtebiliriz. Bu çalışmada, flumetralin de diğer dinitroanilin grubu kimyasallar gibi omurgalı (çalışmamızda: insan lenfosit hücresi) mikrotübülleri üzerinde inhibe edici yani mikrotübül polimerizasyonunu engelleyici önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılabilir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, tarımda yaygın bir şekilde kullanılan insektisit, herbisit ve bitki büyüme düzenleyicisi gibi kimyasal maddelerin birçoğunun toksisite mekanizmasının süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin, hücrenin doğal savunma mekanizmasının nötralize edebileceğinden daha fazla oluşumuyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Linnainmaa, 1984; Reddy ve Rao, 1989; Lioi ve ark., 1998; Giray ve ark. 2001; Banerjee ve ark., 2001; Muniz ve ark., 2008). Mates (2000) tarafından, oluşan bu serbest radikallerin protein, nükleik asit, lipid gibi makromoleküllerle etkileşime girerek hücrede hasara neden olduğu bildirilmiştir. Test maddemiz olan flumetralinin de insan lenfosit hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırarak, bu moleküllerin DNA veya proteinleri etkileyebileceği ve böylece DNA'da tek ve/veya çift zincir kırıklarına neden olabileceği düşünülebilir.

#### **4.1.2. Flumetralinin Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri**

Flumetralin uygulanan insan periferik lenfositlerindeki MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesi (% MNBN) ve MN yüzdesi (% MN), test maddesinin 24 saat muamele süresinde, en düşük konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda (250, 500 ve 1000 µg/ml); 48 saat muamele süresinde düşük iki konsantrasyonda (125 ve 250 µg/ml) hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır. 48 saatlik muamelenin diğer konsantrasyonlarında ise (500 ve 1000 µg/ml) yüksek toksisiteden dolayı yeterli sayıda iki nükleuslu hücre bulunamadığından MNBN hücre %'si ve MN %'si hesaplanamamıştır. Ayrıca, 24 saatlik flumetralin muamelesinin en yüksek konsantrasyonu hariç (1000 µg/ml) diğer tüm süre ve konsantrasyonlarda flumetralin MN oluşumunu pozitif kontrol kadar uyaramamıştır (Çizelge 4.2.).

Flumetralin ile muamele edilen kültürlerdeki MNBN hücre %'si ve MN %'si, 24 saatlik muamelede konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiş fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). 48 saatlik muamele süresinde ise yüksek konsantrasyonlarda yeterli sayıda iki nükleuslu hücre bulunamadığından konsantrasyon-etki ilişkisi belirlenememiştir.

Flumetralin, iki nükleuslu hücrelerde değişik büyüklük ve sayılarda MN oluşumlarına neden olmuştur (Şekil 4.16- Şekil 4.20).

**Çizelge 4.2.** Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferel lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre %'si ve % MN.

| Test Maddesi          | Muamele     |               | MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı |           |         |        | MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si                      | % MN ± SH   |
|-----------------------|-------------|---------------|---|-----------|---------|--------|---|---|
|                       | Süre (saat) | Kons. (µg/ml) | 0   | 1         | 2       | 3      |   |   |
|                       |             |               |   |           |         |        |   |   |
| Negatif Kontrol       | --          | --            | 3986  | 14        | 0       | 0      | 0.35 ±0.05  | 0.35 ±0.05  |
| DMSO (ÇK)<br>MMC (PK) | 24          | 8 µl/ml       | 3984<br>3937                                | 16<br>56  | 0<br>6  | 0<br>1 | 0.40 ±0.08<br>1.57±0.29 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>   | 0.40 ±0.08<br>1.78±0.39 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>   |
| Flumetralin           | 24          | 125           | 3982  | 17        | 1       | 0      | 0.45 ±0.05 c <sub>3</sub>                               | 0.48 ±0.09 c <sub>3</sub>                               |
|                       |             | 250           | 3958  | 37        | 5       | 0      | 1.05 ±0.12 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> | 1.18 ±0.17 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> |
|                       |             | 500           | 3952  | 44        | 4       | 0      | 1.20 ±0.08 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> | 1.30 ±0.08 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>2</sub> |
|                       |             | 1000          | 3937  | 57        | 6       | 0      | 1.58 ±0.12 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                | 1.73 ±0.17 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                |
| DMSO (ÇK)<br>MMC (PK) | 48          | 8 µl/ml       | 3983<br>3784                                | 17<br>199 | 0<br>12 | 0<br>5 | 0.43 ± 0.15<br>5.40±0.67 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>  | 0.43 ±0.15<br>5.95±0.61 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>   |
| Flumetralin           | 48          | 125           | 3958  | 36        | 6       | 0      | 1.05 ±0.17 a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> | 1.20 ±0.14 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> |
|                       |             | 250           | *3350                                       | 42        | 8       | 0      | 1.47 ±0.09 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> | 1.70 ±0.15 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> |
|                       |             | 500           | #   |           |         |        | #   | #   |
|                       |             | 1000          | #   |           |         |        | #   | #   |

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile, c: pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

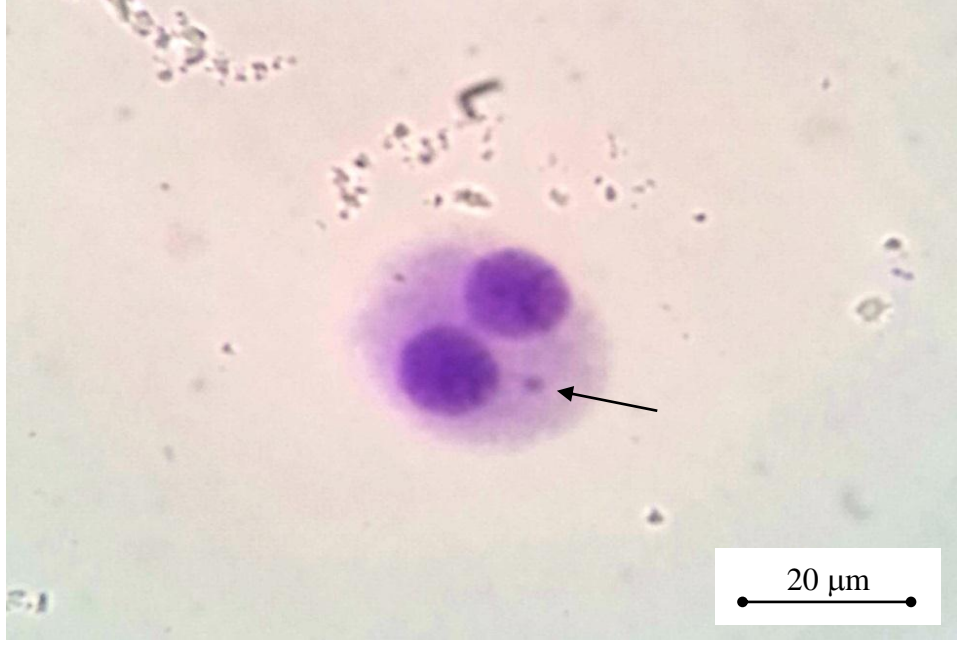
a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P≤0.05 a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P≤0.01 a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P≤0.001

\*Yüksek toksisiteden dolayı 3400 iki nükleuslu hücre incelendi.

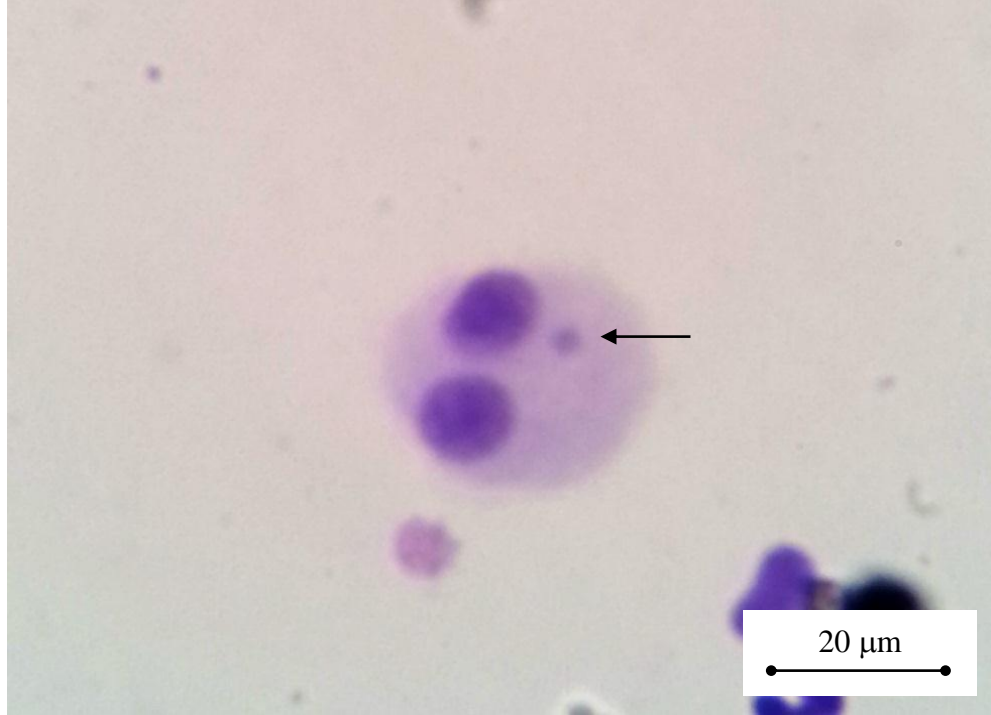
# Yeterli sayıda iki nükleuslu hücre bulunamadı.



Şekil 4.16. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (125 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000.



Şekil 4.17. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (125 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.18. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (250 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000.



Şekil 4.19. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (1000 µg/ml Flumetralin, 24 saatlik muamele, ♀) x1000.



Şekil 4.20. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (250 µg/ml Flumetralin, 48 saatlik muamele, ♂) x1000.

2,6-dinitroanilin grubuna dahil kimyasalların insan periferel kan lenfositlerinde MN oluşumu üzerine etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat, bizim çalışmamıza benzer olarak, Gebel ve ark. (1997) tarafından trifluralinin fare kemik iliği hücrelerinde MN frekansını önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir. Dimitrov ve ark. (2006) da yaptıkları çalışmada, pendimethalinin ticari formülasyonlarından biri olan stomp herbisidinin fare kemik iliği hücrelerinde MN oluşumunu kontrole göre önemli derecede arttırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca, Könen ve Çavaş (2008), trifluralinin *Oreochromis niloticus*'un periferel eritsositlerinde MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığını ve böylece trifluralinin balıklarda genotoksik potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir.

MN, klastojenik etki nedeniyle kromozom veya kromatidlerde kırılmalar sonucu oluşan asentrik kromozom/kromatid fragmentlerinden veya anojenik etki nedeniyle tam kromozom/kromatidlerin hücre bölünmesi sırasında (anafazda iğ ipliklerine uygun bir şekilde tutunamamaları dolayısıyla) yanlış dağılımları sonucu oluşabilir (Heddle ve ark., 1991; Kirsch-Volders ve ark., 1997; 2011; Norppa ve Falck, 2003; Fenech, 2007; Fenech ve Bonassi, 2011, Fenech ve ark., 2011). Ayrıca, multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna neden olabilmektedir (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 2010). Böylece sitokinez-bloklama MN testi ile hem klastojenik hem de anojenik etkiler belirlenebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark., 1997, 2011; Norppa ve Falck, 2003).

Yaptığımız çalışmada, flumetralinin tüm süre ve konsantrasyonlarında, insan lenfosit hücrelerindeki yapısal KA sayısını, sayısal KA'ya göre daha fazla arttırdığını göz önünde bulundurduğumuzda; flumetralin etkisiyle meydana gelen MN'ların muhtemelen bu maddenin klastojenik etkisiyle oluşan asentrik kromozom ya da kromatid/kromozom kırıklarından meydana gelmiş olabileceği düşünülebilir. Ayrıca, çalışmamızda her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) yapısal KA ve MN oluşumu arasında istatistiksel olarak önemli derecede pozitif korelasyon (24 saat için:  $r^2 = 0.960$ ,  $P < 0.05$ ; 48 saat için:  $r^2 = 1$ ,  $P < 0.05$ ) bulunmuş olması bu görüşümüzü desteklemektedir.

## 4.2. Flumetralinin İnsan Periferal Kan Lenfositlerindeki Sitotoksik/Sitostatik Etkileri

### 4.2.1. Flumetralin'in Mitotik indeks (MI ) Üzerine Etkisi

Flumetralinin mitoz bölünme üzerine etkisini incelemek amacıyla tüm süre ve konsantrasyonlardaki mitotik indeks (MI) değerleri belirlenmiştir. Flumetralinin insan periferal kan lenfositlerine 24 saatlik muamelesindeki MI değerleri, düşük iki konsantrasyonda (125 ve 250 µg/ml) sadece negatif kontrole göre, yüksek konsantrasyonlarda ise (500 ve 1000 µg/ml) hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır. 24 saatlik flumetralin muamelesinde en yüksek konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda (250, 500 ve 1000 µg/ml) MI pozitif kontrole göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Yani bu konsantrasyonlarda flumetralin MMC kadar etkili olamamıştır. 1000 µg/ml'lik en yüksek konsantrasyonda ise flumetralinin etkisiyle düşen MI değeri pozitif kontrol kadar olmuştur (Çizelge 4.3).

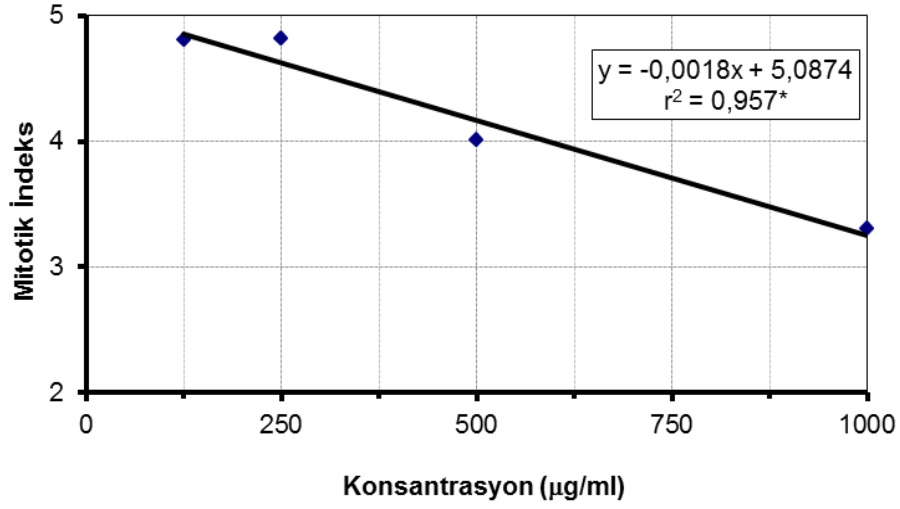
48 saatlik muamelede ise flumetralin uygulanan kültürlerdeki MI, en düşük konsantrasyonda (125 µg/ml) sadece negatif kontrole göre; diğer konsantrasyonlarda (250, 500 ve 1000 µg/ml) hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir azalma göstermiştir. 48 saatlik muamele süresinin yüksek iki konsantrasyonunda (500 ve 1000 µg/ml) flumetralin uygulanan kültürlerdeki MI değeri ile pozitif kontrolün MI değeri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Yani bu konsantrasyonlarda, flumetralin MI'ni MMC kadar düşürmüştür. Oysa, 48 saatlik muamelede düşük olan iki konsantrasyonda (125 ve 250 µg/ml) flumetralin pozitif kontrol kadar etkili olamamıştır (Çizelge 4.3).

MI'deki düşüş, 24 saatlik muamele süresinde konsantrasyona bağlı bulunmuş ( $r^2 = 0.957$ ,  $P < 0.05$ ), 48 saatlik muamele süresinde ise önemli bir konsantrasyon-etki ilişkisi görülmemiştir ( $P > 0.05$ ) (Şekil 4.21).

**Çizelge 4.3.** Değişik konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş olan insan periferal lenfositlerinde MI, nükleus sayısına göre hücrelerin dağılımı ve NBI.

| Test Maddesi          | Muamele     |                 | MI ± SH   | Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı |            |         |         | NBI ± SH   |
|-----------------------|-------------|-----------------|---|---|------------|---------|---------|--|
|                       | Süre (saat) | Kons. (µg/ml)   |   | 1   | 2          | 3       | 4       |  |
| Negatif Kontrol       | --          | --              | 5.73 ±0.46  | 3010                                      | 911        | 41      | 38      | 1.28 ±0.04   |
| DMSO (ÇK)<br>MMC (PK) | 24<br>24    | 8 µl/ml<br>0.20 | 5.47 ±0.34<br>2.74 ±0.30 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>  | 3089<br>3527                              | 846<br>471 | 25<br>2 | 40<br>0 | 1.26 ±0.01<br>1.12±0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>    |
| Flumetralin           | 24          | 125             | 4.80 ±0.46 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>                | 3196                                      | 790        | 7       | 7       | 1.21 ± 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub> |
|                       |             | 250             | 4.81 ±0.60 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>                | 3418                                      | 580        | 1       | 1       | 1.15 ± 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                |
|                       |             | 500             | 4.00 ±0.49 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>2</sub> | 3643                                      | 353        | 2       | 2       | 1.09 ± 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                |
|                       |             | 1000            | 3.30 ±0.75 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                | 3793                                      | 206        | 1       | 0       | 1.05 ± 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> |
| DMSO (ÇK)<br>MMC (PK) | 48<br>48    | 8 µl/ml<br>0.20 | 5.20 ±0.51<br>2.36±0.26 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>   | 3054<br>3611                              | 903<br>388 | 27<br>1 | 16<br>0 | 1.25 ± 0.02<br>1.10±0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>   |
| Flumetralin           | 48          | 125             | 4.61 ±0.55 a <sub>2</sub> c <sub>3</sub>                | 3636                                      | 360        | 3       | 1       | 1.10 ± 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                |
|                       |             | 250             | 3.34 ±0.68 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>2</sub> | 3826                                      | 173        | 1       | 0       | 1.04 ± 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>2</sub> |
|                       |             | 500             | 2.45 ±0.35 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                | 3954                                      | 46         | 0       | 0       | 1.01 ± 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> |
|                       |             | 1000            | 1.85 ±0.31 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>                | 3947                                      | 53         | 0       | 0       | 1.02 ± 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> |

a: Kontrol ile; b:Çözücü kontrol ile, c: pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.  
a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>: P≤0.05    a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>: P≤0.01    a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>: P≤0.001



Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda flumetralin ile 24 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MI'in konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*: P < 0.05

#### 4.2.2. Flumetralinin Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerindeki Etkileri

Flumetralinin nükleus bölünmesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla nükleus bölünme indeksi (NBI) değerleri saptanmıştır. Flumetralin ile hem 24 hem de 48 saat muamele edilen kültürlerdeki NBI değerleri, test edilen bütün konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmış (Çizelge 4.3); fakat bu azalma her iki muamele süresinde istatistiksel açıdan önemli bir konsantrasyon-etki ilişkisi göstermemiştir (P>0.05).

NBI, 24 saatlik muamelede en düşük konsantrasyonda (125 µg/ml) pozitif kontrolden önemli derecede yüksek, 250 ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonlarda pozitif kontrol kadar, en yüksek konsantrasyonda ise (1000 µg/ml) pozitif kontrolden önemli derecede düşük bulunmuştur. 48 saatlik muamelede ise flumetralin NBI değerini, 125 µg/ml'lik konsantrasyonda pozitif kontrol kadar, diğer konsantrasyonlarda (250, 500 ve 1000 µg/ml) ise pozitif kontrolden istatistiksel olarak önemli derecede daha fazla düşürmüştür. Yani, genel olarak flumetralin insan periferal lenfositlerinde nükleus bölünmesini pozitif kontrol olarak kullandığımız MMC kadar ya da ondan daha fazla engellemektedir (Çizelge 4.3).

Yaptığımız literatür araştırmasına göre, flumetralinin sitotoksik etkilerini belirleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Flumetralin gibi 2,6-dinitroanilin grubuna dahil bazı herbisitlerle yapılan çalışmalar incelendiğinde, genel olarak bizim çalışmamıza benzer olarak bu grup maddelerin çeşitli hücre hatlarında sitotoksik etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır.

Sinha ve ark. (1998) tarafından, 20 µg/ml konsantrasyonundaki fluchloralinin 72 saat süre ile CHO hücrelerine muamele edilmesinin apoptosisi indükleyerek sitotoksositeye neden olduğunu; ayrıca, muamele süresinin kısa olsa bile (6 saat) fluchlorinin DNA sentezini % 30-50 arasında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, herbisit muamele edilmiş hücrelerden elde edilen DNA'nın agoroz-jel elektroforezi ve sitokimyasal boyaması sonuçlarına göre fluchloralinin apoptosisi indüklediğini gösterdiğini bildirmişler ve DNA sentezinin engellenmesinin bu maddenin DNA replikasyon enzimleriyle etkileşimine bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Benzer olarak, Patel ve ark. (2007) tarafından pendimethalinin CHO hücrelerine 3 saat muamelesinin sitotoksositeyi arttırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında kullandıkları MTT testinin, pendimethalinin CHO hücrelerine uygulamasının mitokondriyal aktiviteyi düşürdüğünü ispatladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, 1000 µM konsantrasyonundaki pendimethalinin CHO hücrelerine 3 saat muamelesinin bu hücrelerindeki mitokondriyal aktiviteyi % 65'e kadar azalttığını belirlemişlerdir.

Pan ve ark. (2004), pendimethalinin 5 ng/µl (0.017 µM) konsantrasyonunda FRTL-5 (rat thyroid derived cell line) hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Yamano ve Morita (1995) tarafından pendimethalinin sıçan hepatositlerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Fernandes ve ark. (2009), *Allium cepa* kök ucu meristem hücrelerinde 0.84 mg/l ve (24 saatlik uygulama) 3.34 mg/l (24 saat uygulama, daha sonra 48 saat geri dönüştürme=recovery uygulaması) konsantrasyonlarındaki trifluralinin MI'yi kontrole göre önemli derecede düşürdüğünü belirleyerek, bu herbisidin *Allium cepa*'da sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda flumetralinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere MI ve NBI oranları değerlendirilmiştir. NBI, kimyasalların sitostatik etkileriyle de ilgili

önemli bilgiler sağlamaktadır (Fenech, 1997). Sitostatisite hücre çoğalması ve/veya büyümesinin engellenmesi olarak tanımlanabilir ve eğer sitostasis uzarsa, bu başlangıç olayı hücre ölümünü (sitotoksisiteyi) uyarabilir (Rixe ve Fojo, 2007).

Yaptığımız çalışmada, flumetralinin, insan periferel lenfositlerinde her iki muamele süresinde (24 ve 48 saat) ve tüm konsantrasyonlarda MI ve NBI'yi genel olarak hem negatif kontrol hem de çözücü kontrole göre önemli derece düşürdüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, flumetralinin DNA replikasyonunu, nükleus bölünmesini ve mitoz bölünmeyi olumsuz yönde etkileyerek hücre bölünmesini baskı altına aldığı ifade edilebilir. MI ve NBI'daki azalma, hücre döngüsü sürecinin engellendiğinin ve/veya çoğalma kapasitesinin kaybolduğunun bir göstergesidir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, dinitroanilin grubu kimyasallar, bitki ve protozoalarda mikrotübül depolimerize edici ajanlar olarak kabul edilmektedir (Morejohn ve ark., 1987; Morejohn ve Fosket, 1991; Antony ve Hussey, 1999). Fakat, omurgalılarda böyle bir etkisinin olmadığı bilinmektedir (Morejohn ve Fosket, 1986; Morissette ve ark., 2004). Bu grup kimyasallar, yapılarında bulunan NO<sub>2</sub> gruplarıyla bitki tübülünlerine bağlanmakta ve oluşan bu herbisid-tübülün kompleksi mikrotübül formasyonunu ve dolayısıyla hücre bölünmesini engellemektedir. Dinitroanilinler bitkisel hücrelerde bu yolla sitotoksiteye neden olabilmektedirler (Antony ve Hussey, 1999; Fernandes ve ark., 2009). Fakat, bizim çalışmamızda hücre hattı olarak insan periferel kan lenfositleri kullanılmıştır ve KA testinin sonuçlarına göre flumetralin bu hücrelerde istatistiksel olarak önemli derecede kromozom/kromatid kırıkları gibi yapısal anormalliklerin artışıyla sonuçlanan klastojenik aktivite göstermiştir. Bu durum, flumetralinin insan lenfositlerindeki sitotoksisite mekanizmasının mikrotübül oluşumunu engelleyici özelliğinden ziyade daha farklı bir yolla olabileceğini düşündürmektedir.

Birçok araştırmacı tarafından, klastojenik ajanlar tarafından uyarılan yapısal KA'ların ve DNA çift zincir kırıklarının sitotoksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir (Armstrong ve ark., 1992; Galloway ve ark., 1998; Hillard ve ark., 1998; Vock ve ark., 1998; Kirkland ve Müller, 2000). Bu çalışmada, flumetralinin DNA çift ve/veya tek iplik kırıklarına neden olarak hücredeki DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği ve bu yolla sitotoksik/sitostatik etki göstermiş olabileceği söylenebilir. Bunun yanında, Madle (1993) tarafından, KA içeren hücrelerin mitotik

seleksiyon yoluyla döngüden çıkarılarak MI'in düşürülebileceği ileri sürülmüştür. Mitotik seleksiyon, tamir edilemeyecek kadar fazla kromozom anormalliği taşıyan hücrelerin öldürülmesi ve hücre döngüsünden çıkarılması olayıdır.

MI'deki azalmanın enerji üretim merkezindeki bozukluktan ve ATP seviyesindeki azalmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Epel, 1963; Jain ve Andsorbhoy, 1988; Yüzbaşıoğlu ve ark. 2006). Ayrıca, DNA sentezinin ve hücre proliferasyonunun engellenmesi, hücre döngüsüne spesifik olan bazı protein ve/veya enzimlerin baskılanması sonucu da meydana gelebilmektedir (Hung ve ark., 1996). Yüzbaşıoğlu ve ark. (2006) MI'deki azalmanın, hücrelerin mitozaya girmesini sağlayan G2 safhasının engellenmesinden veya uzamasından da kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Bunlardan biri veya birkaçı da flumetralinin insan periferel kan lenfositlerindeki sitotoksik etkisinden sorumlu olabilir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, herbisit etkinliğine de sahip sentetik bir bitki gelişim düzenleyicisi olarak günümüz tarımında yaygın bir şekilde kullanılan flumetralinin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri *in vitro* KA ve MN testleri kullanılarak araştırılmıştır.

Flumetralin, 24 ve 48 saat süre ile insan periferal lenfositlerine muamele edildiğinde, yüksek üç konsantrasyonda (250, 500 ve 1000 µg/ml) yapısal KA frekansını hem negatif hem de çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede arttırarak genotoksik etki göstermiştir. Bu çalışmada, flumetralinin sayısal KA üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, flumetralinin insan lenfositleri üzerinde özellikle klastojenik etki göstererek kromatid/kromozom kırıkları meydana getirdiği, fakat iğ iplikleri üzerine önemli bir olumsuz etkisinin olmadığını belirtebiliriz. Ayrıca, yapmış olduğumuz MN testine göre, flumetralinin 24 saatlik muamelenin yüksek konsantrasyonlarında (250, 500 ve 1000 µg/ml) ve 48 saatlik muamelenin 125 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarında MN oluşumunu negatif ve çözücü kontrole göre önemli derecede arttırması ve yapısal KA ve MN oluşumu arasında pozitif korelasyon bulunması, bu maddenin insan lenfositlerinde klastojenik etkiye sahip olabileceği fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak, yaptığımız KA ve MN testine göre, 2,6-dinitroanilin kimyasal sınıfına dahil edilen flumetralinin insan lenfositleri üzerinde klastojenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar dinitroanilinler, mikrotübül-depolimerize edici kimyasallar olarak karakterize edilmişlerse de (Morejohn ve ark., 1987; Morejohn ve Fosket, 1991; Antony ve Hussey, 1999); bu gruba giren kimyasalların seçici bir şekilde bitki ve protozoa miktotübüllerini inhibe ederek anojenik etki gösterdiği fakat fungal ve omurgalılarıdaki mikrotübüllere etki edemediği de bilinmektedir (Morejohn ve Fosket, 1986; Morissette ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda kullanılan hücre hattı insan lenfosit hücresi olup, flumetralinin bu hücrelerde sayısal KA üzerine önemli bir etkisinin olmadığı (dolayısıyla anojenik etki göstermediği/mikrotübül oluşumunu engellemediği) belirlenmiştir. Bu da dinitroanilinlerin omurgalılarıda mikrotübül inhibe edici etkisinin olmadığı görüşünü desteklemektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, flumetralin test edilen tüm konsantrasyon (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml) ve muamele sürelerinde (24 ve 48 saat), MI ve NBI frekanslarını kontrol gruplarına göre önemli derecede düşürerek, insan lenfositleri üzerinde sitotoksik/sitostatik etki göstermiştir.

Literatür araştırmamıza göre, flumetralinin muhtemel genotoksik etkilerini belirlemeye yönelik yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın, flumetralinin insan periferel kan lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik ve sitotoksik potansiyelini gösteren ilk çalışma olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber, flumetralinin muhtemel genotoksikolojik potansiyelini belirlemeye yönelik değişik hücre hatları ve test sistemleriyle ilave *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmasının uygun olacağı düşüncesindeyiz.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, flumetralinin insanlar için genotoksik ve sitotoksik riske sahip olma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ürün yetiştiricilerinin bu maddeyi kullanırken uygulama zamanı ve dozuna dikkat etmesi, aşırı kullanımından kaçınmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, özellikle bu gibi kimyasallara üretim ve uygulama aşamasında maruz kalan işçiler, çocuklar, hamile bayanlar ve yaşlılar başta olmak üzere, tüm insanların bu maddelere maruziyetinin minimuma indirilmesi için gerekli önleyici tedbirleri almasının gerekliliği açıktır. Bundan başka, flumetralinin özellikle tütün bitkilerinde kullanıldığı dikkate alınırca, sigara kullanımı da bu maddeye maruziyeti kaçınılmaz kılacaktır. Bu nedenle tütün kullananların, sigaranın bilinen zararlı etkilerinin yanında flumetralinin genotoksik potansiyelini de göz ardı etmemeleri yerinde olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Anderson, D., 1988. Human Biomonitoring. **Mutation Research**, 204: 353-541.
- Anonymous -<http://agron-www.agron.iastate.edu>: Access date June 2014.
- Anthony, R.G. and Hussey, P.J., 1999. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends in Plant Sciences**, 4:112–116.
- Armstrong, M.J., Bean, C.L., Galloway, S.M., 1992. A quantitative assessment of cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, 265:45–60.
- Aydoğdu, M. ve Boyraz, N., 2005. Bitki Büyüme Düzenleyicileri (hormon) ve Hastalıklara Dayanıklılık (Derleme) Zirai Karantina Müdürlüğü, Antalya, Türkiye Selçuk Üniversitesi **Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü**, Konya, Türkiye.
- Babaoğlu, M., 2002. Bitki büyüme düzenleyicileri Türkiye'deki durum ve sağlık açısından değerlendirmeler. **Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi**, Ders Notları. Konya.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev Environ Health**, 16:1-40.
- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prá, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., Puntoni, R., 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of a future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 79:133-135.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: An epidemiologic perspective. **Cytogenet Genome Res** 104:376–382.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D., 2005. Human population with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future prospectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 45:258-270.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, MR., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, 28:625-631.
- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I-L., Knudsen, L.E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R.J., Boffetta, P., 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. **Carcinogenesis**, 29:1178-1183.

- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M., 2011. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. **Mutagenesis**, 26:93-100.
- Bozari, S. and Aksakal, O., 2013. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genotoxic effect of trifluralin on maize (*Zea mays*). **Drug and Chemical Toxicology**, 36:163-169.
- Carrano, A.V. and Natarajan, A.T., 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, 204:379-406.
- Coresta., 2014. Agrochemicals Analysis Technical Note, TN002-Dinitroanilines.
- Dearfield, K.L., Mc Carroll, N.E., Protzel, A., Stack, H.F., Jackson, M.A., and Waters M.D., 1999. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II. Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloroacetanilides and related compounds. **Mutation Research** 443:183-221.
- Dimitrov, B.D., Gadeva, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V., 2006. Comparative genotoxicity of the herbicides roundup, stomp and reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, 21:375-382.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 13:34-43.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumetralin. **European Food Safety Authority Journal** 12(12):3912, 62 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3912.
- El-Zein, R., Vral, A., Etzel, C.J., 2011. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, 26:101-106.
- Epel, D., 1963. The effects of carbon monoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg. **Journal of Cell Biology**, 17:315-319.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, 392:11-18.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455:81-95.
- Fenech, M., 2002a. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, 181-182: 411-416.
- Fenech, M., 2002b. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, 7:1128-1137.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2(5):1084-1104.
- Fenech, M. and Bonassi, S., 2011. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. **Mutagenesis**, 26:43-49.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D., Thomas, P., 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis** 26: 125-32

- Fernandes, C., Mazzeo, D., Morales, M., 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Saˆo Paulo State University**. Av.24A, 1515, Bela Vista, CEP13506-900 Rio Claro, SP, Brazil.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., Nichols, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: Comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens. **Mutation Research**, 400:169-186.
- Garriott, M.L., Adams, E.R., Probst, G.S., Emmerson, J.L., Oberly, T.J., Kindig, D.E.F., Neal, S.B., Bewsey, B.J., Rexroat, M.A., 1991. Genotoxicity studies on the preemergence herbicide trifluralin. **Mutation Research**, 260:187-193.
- Gebel, T., Kevekortcs, S., Pav, K., Edenharder, R., Dunkelberg, H., 1997. *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Archives of Toxicology**, 71:193-197.
- Ghiazza, F.G., Zavarise, G., Lanero, M., Ferraro, G., 1984. SCE (sister chromatid exchange) induced in chromosomes of human lymphocytes by trifluralin, atrazine and simazine (Ital.). **Bollettino- Societa Italiana Biologia Sperimentale**, 60:2149-2153.
- Giray, B., Gurbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. **Toxicology Letter**, 118: 139-146.
- Güven, B. 2014. 1-Naphthylacetamide'nin insan periferel kan lenfositlerindeki *in vitro* genotoksik ve sitotoksik etkileri. **Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi. Kod No: 727.
- Hagmar, L., Brögger, A., Hansteen, I-L., Heim, S., Högstcdt, B., Knudaen, L., Lambert, B., Linnanmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. and Sorsa, M., 1994. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: nordic study group on the health risk of chromosome damage. **Cancer Research**, 54: 2919-2922.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brögger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer—a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). **Cancer Research**, 58:4117-4121.
- Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., Hansteen I-L, Knudsen, L.E., Lindholm, C., Norppa, H., 2004. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: Results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, 64:2258-2263.
- Hermann, J.E., Hayes, R.M., Mueller, T.C., 2000. Pendimethalin and flumetralin degradation under controlled conditions in four soils. **Tobacco Science**, 44:35-40.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P.H., Mac Gregor, J.T., 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 18:277-291.

- Hillard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M., 1998. Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 31:316-326.
- Hung, D.T., Jamison, T.F., Schreiber, S.L., 1996. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. **Chemistry & Biology**, 3:623-639.
- IARC (International Agency for Research on Cancer)., 1991. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. **International Agency for Research on Cancer**, Vol. 53, Lyon, France.
- Iarmarcovai, G., Ceppi M., Botta, A., Orsière, T., Bonassi, S., 2008. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. **Mutation Research**, 659:274-283.
- Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides. III. Concluding Remarks. **Cytologia**, 53:427-436.
- Kaya, B., Marcos, R., Yanikoğlu, A., Creus, A., 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. **Mutation Research**, 557(1):53-62.
- Keseru, M., Budai, P., Várnagy, L., Szabó, R., Juhász, E., Babinszky, G., Pongrácz, A., 2004. Teratogenicity study of some pesticides in chicken embryos. **Commun Agric Appl Biol Sci.**, 69(4):803-6.
- Könen, S. and Çavaş, T., 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation treflan using the Piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 49:434-438.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: The importance of thresholds. **Mutation Research**, 464:137-147.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., 1997. The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutation Research**, 392:19-30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T, Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, JrM., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, 540:153-163.
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K.V., Decordier, I., 2011. The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, 85:873-899.
- Linnainmaa, K., 1984. Induction of sister chromatid exchanges by the peroxisome proliferators 2,4-D, MCPA, and clofibrate in vivo and in vitro. **Carcinogenesis**, 5:703–707
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini, MV., 1998. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, 403:13–20.

- Liou, S.H, Lung, C., Chen, Y.H., 1999. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. **Cancer Research**, 59:1481-1484.
- Madle, S., 1993. Problem of the harmonization of the philosophies for genotoxicity testing. **Mutation Research**, 300 (2): 73-76
- Marcano, L., Carruyo, I., Campo, A.D., Montiel, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, 94: 221-226.
- Matés, J.M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, 153: 83-104.
- Morejohn, L.C., and Fosket, D.E., 1986. Tubulins from plants fungi and protists: A review. In: Shay JW, editor. **Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton**. New York: Plenum Publishing Corp. pp 257-329.
- Morejohn, L.C., and Bureau, T.E., Molè-Bajer, J., Bajer, A.S., Fosket, D.E., 1987. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, 172:252-264.
- Morejohn, L.C., and Fosket, D.E., 1991. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cell. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 51:217-230.
- Morissette, N.S., Mitra, A., Sept, D., Sibley, D., 2004. Dinitroanilines bind a-tubulin to disrupt microtubules. **Molecular Biology of the Cell**, 15:1960-1968.
- Morsünbül, T., Solmaz, S.K.A., Üstün, G.E., Yonar, T., 2010. Bitki gelişim düzenleyici (bgd)'lerin çevresel etkileri ve çözüm önerileri. **Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi**, 15 (1): 1-11.
- Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev ,M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V., Kisby, G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers:a pilot study. **Toxicol Appl Pharmacol**, 227:97-107.
- Murgia, E., Ballardini, M., Bonassi, S., Rossi, A.M., Barale, R., 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. **Mutation Research**, 639:27-34.
- Norppa, H. and Falck, G.C.M., 2003. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, 18:221-233.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Šrám, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., 2006. Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research**, 600(1-2):37-45.
- PAN (Pesticide Action Network International), 2014. International List of Highly Hazardous Pesticides (June 2014). © PAN International c/o PAN Germany, Nernstweg 32, 22765 Hamburg, Germany.
- Pan, H., Sun, D., Wang, J., Wu, D., 2004. Using the FRTL-5 cell to screen the thyroxine disrupting effects of the two pesticides-ethylenethiourea and pendimethalin. **Wei Sheng Yan Jiu**, 33:267-269.

- Panneerselvam, N., Sinha, S., Shanmugam, G., 1995. Genotoxicity of the herbicide fluchloralin on human lymphocytes in vitro: Chromatid aberrations and micronucleus tests. **Mutation Research**, 344:69-72.
- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A.K., Parmar, D., Dhawan, A., 2007. In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. **Toxicology in Vitro**, 21:1409-1418.
- Paz-y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E., Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. **Environmental Health Perspectives**, 110:1077-1080.
- Pilinskaia, M.A., 1987. Evaluation of the cytogenetic effect of the herbicide trifluralin and of a number of its metabolites on mammalian somatic cells. **Tsitol Genet**, 21:131-135.
- Preston, R.J., San Sebastian, J.R., McFee, A.F., 1987. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research**, 189:175-83.
- Reddy, J.K., and Rao, M.S., 1989. Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis. **Mutation Research** 214:63-68
- Rencüzoğulları, E. ve Topaktaş, M., 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-b. **Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, (5), 19-24.
- Ribas, G., Frenzilli, G., Barale, R., Marcos, R., 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, 344:41-54.
- Ribas, G., Surrallés, J., Carbonell E, Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1996. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed in vitro. **Mutation Research**, 371:15-21.
- Rixe, O., and Fojo, T., 2007. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? **Clin Cancer Res**, 13:7280-7287.
- Rossner, P., Boffetta, P., Ceppi, M., Bonassi, S., Smerhovsky, Z., Landa, K., Juzova, D., Šrám, R.J., 2005. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. **Environmental Health Perspectives**, 113:517-520.
- Sade, B., 2000. **Bitki Fizyolojisi**. Selçuk Üniv. Zir. Fak. Ders Kitapları Yayın no:29. Konya
- Sinha, S., Panneerselvam, N., Shanmugam, G., 1998. Fluchloralin is cytotoxic and genotoxic and induces apoptosis in mammalian cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 31:257-262.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A. and Marcos, R., 1995. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. **Mutation Research**, 342: 43-59.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human

- lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, 388 (1): 85-95.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E., 2010. **Sitogenetik**, Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi, Yayın no: 99, ISBN:978-605-395-295-4, Ankara.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 2007. EPA 738-R-07-012 (September 2007)., **Registration eligibility decision (RED) Document for Flumetralin**, USEPA.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency)., 2014. Chemicals evaluated for carcinogenic potential office of pesticide programs. **U.S. Environmental Protection Agency**, October 2, 2014.
- Várnagy, L., Varga, T., Hlubik, I., Budai, P., Molnár, E., 1996. Toxicity of the herbicides Flubalex, Fusilade S and Maloran 50 WP to chicken embryos after administration as single compounds or in combination. **Acta Vet Hung**, 44(3):363-76.
- Várnagy, L., Budai, P., Molnár, E., Susan, M., Fáneci, T., 2002. Toxicity and degradation of benefin in chicken embryos. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd **Toegep Biol Wet**, 67(2):111-115.
- Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D., Vamvakas, S., 1998. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and c-irradiation. **Mutation Research**, 413:83-94.
- Weber, J.B., 1990. Behavior of dinitroaniline herbicides in soil. **Weed Technology**, 4:394-406.
- Yamano, T. and Morita, S., 1995. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 1:1-7.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, 604(1-2): 53-59.
- Zahm, S.H. and Blair, A., 1992. Pesticides and non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Research**, 52:5485-5488.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Sevcan BUCAK 18.01.1988 tarihinde HATAY’da doğdu. Antakya Hüseyin Özbuğday Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi’nden 2010 yılında mezun oldu ve aynı yıl Biyoloji Bölümünde yüksek lisans programını başladı. Bu süreç içerisinde bazı kurum ve kuruluşlarda biyoloji öğretmeni ve biyolog olarak görev aldı.