

**TRICHLORFON VE PHORATE İNSEKTİSİTLERİNİN İNSAN
LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

İlknur TİMOROĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2009

ANKARA

İlknur TİMOROĞLU tarafından hazırlanan “TRICHLORFON VE PHORATE İNSEKTİSİTLERİNİN İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Orhan ARSLAN
Biyoloji Eğitimi, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Zekiye SULUDERE
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tarih:03/09/2009

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

Prof. Dr. Nail ÜNSAL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

İlknur TİMOROĞLU

TRICHLORFON VE PHORATE İNSEKTİSİTLERİNİN İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

İlknur TİMOROĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2009

ÖZET

Bu çalışmada organofosfatlı insektisitlerden Trichlorfon ve Phorate'ın *in vitro* genotoksik etkileri insan periferal lenfositlerinde kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca Trichlorfon ve Phorate'ın mitotik indeks (Mİ), replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) üzerine etkileri de incelenmiştir. Trichlorfon'un 2,34; 4,69; 9,38; 18,75 ve 37,50 µg/ml'lik konsantrasyonları ve Phorate'ın 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 ve 2,00 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Her iki insektisit de hemen hemen tüm uygulama sürelerinde ve konsantrasyonlarda KA frekansını doza bağlı olarak artırmıştır. Trichlorfon ve Phorate KKD/hücre frekansını tüm uygulama sürelerinde (24 ve 48 saat) ve konsantrasyonlarda artırmıştır. Trichlorfon uygulamalarındaki bu artış doza bağlıdır. Her iki insektisit de mikronükleus frekansını hemen hemen tüm konsantrasyonlarda önemli düzeyde artırmıştır. Trichlorfon'un 48 saatlik uygulamasının en yüksek konsantrasyonunun toksik olduğu gözlenmiştir. Trichlorfon ve Phorate uygulamaları Rİ ve NBİ üzerinde önemli olmayan düşüşe neden olmuştur. Bununla birlikte Trichlorfon mitotik indeksi 24 saatlik uygulamanın 9,38 ve 18,75 µg/ml'lik ve 48 saatlik

uygulamanın 18,75 µg/ml'lik konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli şekilde düşürmüştür. Diğer insektisit Phorate ise mitotik indekste hemen hemen tüm konsantrasyonlarda önemli düşüşe sebep olmuştur. Comet testi sonuçları her iki insektisit de tüm uygulamalarda primer DNA hasarını artırdığını göstermiştir. Trichlorfon comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu tüm uygulamalarda artırmıştır. Phorate kuyruk yoğunluğunu yalnız en yüksek konsantrasyonda önemli düzeyde artırırken, kuyruk uzunluğunu tüm konsantrasyonlarda anlamlı oranda artırmıştır. Elde edilen bulgular, çalışmada kullanılan insektisitlerin kültüre alınmış ve izole edilmiş insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik, anöjenik ve DNA hasarını indükleyici olduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048
Anahtar Kelimeler : Trichlorfon, Phorate, organofosfatlı insektisitler, genotoksik etki, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet testi
Sayfa Adedi : 99
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Deniz YÜBAŞIOĞLU

THE GENOTOXIC EFFECTS OF TRICHLORFON AND PHORATE
INSECTICIDES IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

(M.Sc. Thesis)

İlknur TİMOROĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

September 2009

ABSTRACT

In this study, the *in vitro* genotoxic effects of organophosphorus insecticides Trichlorfon and Phorate were investigated using chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronucleus (MN) and comet methods in human peripheral lymphocytes. Effects of Trichlorfon and Phorate on the mitotic index (MI), replication index (RI) and nuclear division index (NDI) were also investigated. 2.34; 4.69; 9.38; 18.75 and 37.50 µg/ml concentrations of Trichlorfon and 0.25; 0.50; 1.00; 1.50 and 2.00 µg/ml concentrations of Phorate were used. Both insecticides significantly increased the frequency of CAs almost all treatment times and concentrations in a dose-dependent manner. Trichlorfon and Phorate increased SCEs/cell in all treatment times (24 h and 48 h) and concentrations. This increase was dose-dependent in Trichlorfon treatment. Both insecticides significantly increased the micronuclei frequency at almost all concentrations. The highest concentrations of Trichlorfon was found to be extremely toxic at 48 h treatment. Trichlorfon and Phorate treatments insignificantly decreased the RI and NDI. However, Trichlorfon significantly decreased the MI at 9.38 and 18.75 µg/ml concentrations for 24 h and at 18.75 µg/ml for 48 h. Other insecticide Phorate significantly decreased the MI at almost all concentrations. According to the comet assay results, primer DNA damage were significantly increased by all

treatments of both insecticides. For Trichlorfon comet tail length and tail intensity were increased by all treatments. Even though Phorate significantly increased the tail intensity at only highest concentration, tail length was significantly effected by all concentrations. The results of experiments showed that the insecticides used in this study have clastogenic, mutagenic, aneugenic and DNA damaging effects in cultured and isolated human lymphocytes.

Science Code : 203.1.048
Key Words : Trichlorfon, Phorate, organophosphorus insecticides, genotoxic effects, chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN), comet assay
Page Number : 99
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarımın hem deney hem de yazım aşamalarında hiÇbir zaman yardımını, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen hocam DoÇ. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na; deneyimleriyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; Yüksek Lisans süresi boyunca bıkmadan usanmadan bana her konuda yardım eden ve dostluklarını esirgemeyen hocalarım Yard. DoÇ. Dr. Hüseyin AKSOY'a, Yard. DoÇ. Dr. Serkan YILMAZ'a, AraŐ. Gör. Gökçe TANER'e ve laboratuvarında her aŐamada yardımlarını gördüğüm tüm arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca benden Yüksek Lisans çalıŐmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Turgut TİMOROĞLU'na, büyükbabam İbrahim GEBEŐOĐLU'na, geceler boyu bana yardım etmek için uykusuz kalan ve sabırla hep yanımda olan annem Selma TİMOROĞLU ve anneannem Süheyla GEBEŐOĐLU'na, her konuda bana her zaman yardımcı olan sevgili kardeşim Celil TİMOROĞLU'na da teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Pestisitler.....	3
2.2. Pestisitlerin Kullanımı.....	4
2.3. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	5
2.4. İnsektisitler	6
2.4.1. Organik fosforlular (Organofosfatlı insektisitler).....	6
2.4.2. Karbamatlılar.....	8
2.4.3. Piretroitler.....	8
2.4.4. Klorlanmış hidrokarbonlar.....	10
2.4.5. Diğer kimyasal sınıflar.....	11
2.5. Mutajenite Testleri.	11
2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi.....	13
2.5.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi.....	15

	Sayfa
2.5.3. Mikronükleus (MN) testi.....	16
2.5.4. Comet testi.....	18
2.6. Trichlorfon'un Canlılar Üzerine Etkileri.	21
2.7. Phorate'ın Canlılar Üzerine Etkileri.....	27
2.8. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar.....	30
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	34
3.1.2. Test materyali.....	34
3.2. Metot.....	36
3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar	36
3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. Trichlorfon'un KA Üzerine Etkileri.....	44
4.2. Trichlorfon'un KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri	49
4.3. Trichlorfon'un MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri	52
4.4. Trichlorfon'un Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkileri.....	54
4.5. Phorate'ın KA Üzerine Etkileri.....	56
4.6. Phorate'ın KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri.....	62
4.7. Phorate'ın MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri.....	64
4.8. Phorate'ın Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkileri.....	66

	Sayfa
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Trichlorfon'un çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri.....	22
Çizelge 2.2. Trichlorfon insektisiti ile yapılan genotoksik araştırmalar.....	24
Çizelge 2.3. Phorate'ın çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri.....	27
Çizelge 2.4. Phorate insektisiti ile yapılan genotoksik araştırmalar.....	28
Çizelge 4.1. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları.....	45
Çizelge 4.2. Trichlorfon'un insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkileri.....	50
Çizelge 4.3. Trichlorfon'un insan lenfosit kültüründe MN frekansları ve NBİ üzerine etkileri.....	52
Çizelge 4.4. Trichlorfon ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....	54
Çizelge 4.5. Phorate uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anormalliklerin tipleri ve frekansları.....	57
Çizelge 4.6. Phorate'ın insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkileri.....	62
Çizelge 4.7. Phorate'ın insan lenfosit kültüründe MN frekansları ve NBİ üzerine etkileri.....	65
Çizelge 4.8. Phorate ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı.....	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz.....	18
Şekil 2.2. Comet tekniği kullanılarak hazırlanan kültür eşitleri.....	20
Şekil 2.3. Comet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri.....	21
Şekil 3.1. Trichlorfon insektisitinin yapısal formülü.....	34
Şekil 3.2. Phorate insektisitinin yapısal formülü.....	35
Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dördü kardeş kromatid değişimleri.....	40
Şekil 4.1. Trichlorfon'un anormal hücre frekansı üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.2. Trichlorfon'un kardeş kromatid değişimi frekansı üzerine etkisi.....	50
Şekil 4.3. Trichlorfon'un mitotik indeks üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.4. Trichlorfon'un mikronükleus frekansı üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.5. Trichlorfon'un kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.6. Phorate'ın anormal hücre frekansı üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.7. Phorate'ın kardeş kromatid değişimi frekansı üzerine etkisi.....	63
Şekil 4.8. Phorate'ın mitotik indeks üzerine etkisi.....	64
Şekil 4.9. Phorate'ın mikronükleus frekansı üzerine etkisi.....	65
Şekil 4.10. Phorate'ın kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu üzerine etkisi.....	67

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler.....	46
Resim 4.2. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri.....	51
Resim 4.3. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	53
Resim 4.4. Trichlorfon ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	55
Resim 4.5. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler.....	58
Resim 4.6. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri.....	63
Resim 4.7. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler.....	66
Resim 4.8. Phorate ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
LD ₅₀	Letal doz 50
µg/ml	Mikrogram/ Mililitre
µl	Mikrolitre
mA	Miliamper
mg/kg	Miligram/ Kilogram
mg/ml	Miligram/ Mililitre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı
V	Volt
Kısaltmalar	Açıklama
BrdU	Bromodeoksiüridin
CAs	Chromosomal aberretions
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cyt-B	Sitokalsin-B
DDT	Diklorodifeniltriokloreten
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar**DNA****EDTA****H₂O₂****KA****KCL****KKD****Mİ****MMC****MN****NaCl****NaOH****NBİ****PBS****Rİ****SCEs****SSC****S9****Açıklama**

Deoksiribonükleikasit

Etilendiaminotetra asetik asit

Hidrojen Peroksit

Kromozomal anormallikler

Potasyum Klorür

Kardeş kromatid değişimi

Mitotik indeks

Mitomisin-C

Mikronükleus

Sodyum Klorür

Sodyum Hidroksit

Nükleer bölünme indeksi

Fosfat Tamponu

Replikasyon indeksi

Sister chromatid exchanges

Salin sitrat tamponu

Karaciğer özütü

1. GİRİŞ

İnsanlar, kırsal yaşamdan yerleşik hayata geçişleri ile başlayan tarımsal çalışmalarında mahsullerine zarar veren böcek, fare, kuş ve mikroorganizmalara savaş açmışlardır. Tarım ürünlerini koruma ve üretme aşamasında bazen rastlantı sonucu bazen de bilinçli yapılan denemelerde pestisit denilen kimyasalları kullanmaya başlamışlardır. Günümüzde bu amaçla kullanılmaya başlayan pestisitler sayesinde ürün miktarı ve kalitesi artırılmıştır. Aynı zamanda pestisitlerin üretilen tarım ürünlerinin taşınması, depolanması gibi aşamalarında da bazı fungus ve bakterilerin üremesini ve bunların oluşturduğu toksinlerin de yayılmasını engellediği tahmin edilmektedir [Bulut ve Tamer, 1996; Güler ve Çobanoğlu, 1997; Vural, 2005]. Fakat günümüzde insan ve hayvan sağlığını tehdit ederek doğal dengeyi etkileyen en önemli tehlikelerden biri olmuşlardır. Her geçen gün artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak, gelişen endüstri ve daha uygar bir şekilde yaşama isteği pestisit kullanımını her geçen gün artırmıştır. 19. yy. başlarında tarım ürünlerine zarar veren organizmalara karşı ilk olarak inorganik pestisitler kullanılmıştır. 1940'lerden sonra inorganik pestisitlerin yerini organik kimyadan faydalanılarak üretilenler almıştır. Bunun sonucunda da DDT ve diğer pestisitler keşfedilmiştir. Kimyasal pestisitlerden kullanılmak üzere üretilen 6000 kadar sentetik bileşiğin patentli olmasına rağmen sadece 600 kadarı ticari amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Ülkemizde yetiştirilen kültür bitkilerinden 1/3'ü; 200'den fazla tarım zararlısı ve hastalık etkenlerinden dolayı kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi için daha uzun yıllar pestisitlerin kullanımının artacağı kuşkusuzdur [<http://www.zmo.org.tr/genel>, 2008].

Pestisitlerin, ortamda birikerek miktarlarındaki sürekli artış, bunun yanı sıra kalıcı bir etkiye sebep olmaları canlılar üzerinde akut, subakut ve kronik zehirlenmelere yol açmaktadır. Bu zehirlenmeler sonucu pestisitlere maruz kalan hedef dışı birçok organizmada da mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkiler görülebilmektedir.

Sarin, tabun, ve soman gibi bazı pestisitlerin de kitle imha silahı olarak kullanıldıkları tespit edilmiştir. II. Dünya Savaşı sırasında ilk olarak kullanılmıştır.

Özellikle sinir gazı olarak kullanılan bu gazların organofosfat türevi olduğu bilinmektedir.

Pestisitlerin bu gibi olumsuz yanları olmasına rağmen boya sanayisinde, temizlik malzemesi olarak ve benzeri birçok alanda kullanılmaktadır. Bu kimyasalların uygulanması sırasında seçici toksik özellik göstererek hedef dışı canlılara zarar vermemesi gerekmektedir.

Pestisitlerin bilinçsizce ve tüzük dışı kullanılması hedef organizmaların dışında kalan canlılara da zarar vermektedir. Pestisitler sağlığa zarar vermeyecek dozda kullanılsalar dahi zamanla vücutta birikerek doğrudan ya da dolaylı yoldan insan sağlığını tehdit etmektedir. Pestisitlerin kanser, genetik değişim, sinir hastalıkları ve ölüme yol açtığı birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir. Pestisitlerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *in vivo* testlerin yanısıra *in vitro* test yöntemleri de kullanılmaktadır. İnsan lenfosit kültürü kullanılarak *in vitro* olarak uygulanan genotoksisite testleri arasında kromozomal anormallik, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus testleri en yaygın ve geçerli olanlardır. Ayrıca kimyasalların primer DNA hasarını indükleyip indüklediği de, son yıllarda geliştirilen comet testi kullanılarak belirlenmektedir [Yılmaz ve ark., 2008].

Bu çalışmanın amacı, tarım ürünlerine zarar veren organizmaları yok etmek için kullanılan Trichlorfon ve Phorate insektisitlerinin genotoksik etkilerini insan lenfositlerinde kromozom anormallikleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve comet teknikleri ile araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

Pestisitler tarımsal mücadele sonucunda çevreye karışan ve ortamda güçlükle parçalanan yapay maddelerdir. Pestisitlerin kullanılan etkin madde miktarı gelişmiş ülkelerde kısa sürede ton ile ölçülmeye başlamıştır. Pestisitler zararlılara karşı veteriner hekimlik ve tarımsal mücadelede sıklıkla başvurulan kimyasallardır. Çeşitli pestisitler günümüzde iç ve dış birçok parazite karşı koruyucu olarak kullanılmaktadır. Tarımsal mücadelede fayda sağlayan fakat doğada kimyasal kirlenmeye sebep olan ve canlılar arasındaki besin zincirini veya direkt insan sağlığını tehdit eden maddelerdir [Ekebaş ve ark., 2000]. Pestisitlerin kullanımının insan ve çevre üzerindeki etkisi kestirilemediği için denetleme düzenli bir şekilde yapılmamıştır. Ancak 70'li yıllardan sonra DDT'nin hedef canlılar dışındaki doğal çevreye verdiği zararlı etkinin tesbit edilmesiyle DDT ve bu maddeye benzer kimyasalların kullanım ve satışı kurallara bağlanmıştır [Edwards, 1973].

Pestisit kullanımında pek çok hedef dışı canlı etkilenmektedir. Özellikle de insektisitlerin hedef organizmalar ile birlikte toplu kuş, balık ve memeli ölümlerine sebep oldukları belirlenmiştir [Coppage, 1971; Hill ve Fleming, 1982]. Besin zincirine dahil olan pestisitlerin, biyotik ve abiyotik çevrede birikmeleri önemli bir çevresel sorun oluşturmaktadır. Ne zaman, nerede, nasıl etkileşime girdiği ve uzun zaman sürecinde insanlara nasıl etki edeceği bilinemediğinden pestisitlerin kullanımında problemler ortaya çıkmaktadır [Klinkhardt, 1993].

Yapılan bir çok çalışmada pestisitlerin serbest radikallere ve DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Pestisitler, oksidatif stres, serbest radikal üretimi, antioksidanlarda değişim gibi olaylara yol açabilirler. Pestisitlerin önemli zehirlenme mekanizmalarından biri lipit peroksidasyondur [Kehrer, 1993]. Çünkü lipit peroksidasyonu sırasında fazla miktarda reaktif oksijen grubunun açığa çıkması, glutatyon tükenmesi, selenyum (Se), bakır gibi bazı metallerin eksikliği veya fazlalığı DNA, RNA ve hücre zarları gibi yapılarda hasara sebep olmaktadır. Bu

durum, pestisitlerin sinirler, kaslar, karaciğer, böbrek ve benzeri yerlerde yol açtıkları hasarın başlıca nedenleri arasındadır [Kaya ve ark., 1998].

Eğer serbest radikallerin etkileri nötralize edilemezse;

- a) Hücre membran proteinleri yıkılarak hücrenin ölmesine sebep olur.
- b) Membranda bulunan protein ve lipitlerin yok olmasını sağlayarak hücrenin fonksiyonunu engellerler.
- c) Nükleer membranın yapısını bozarak; hücrenin üremesi ve büyümesini sağlayan genetik materyali kırılma ve mutasyonlara savunmasız hale getirirler.
- d) Bağışıklık sistemindeki hücreleri etkileyerek bağışıklık sistemini zorlarlar.
- e) Yaşlanma ve kanser gibi olaylara sebep olabilirler [Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000].

2.2. Pestisitlerin Kullanımı

Zirai ilaç yapımında aktif maddeler doğrudan kullanılmamaktadır. Aktif maddelere bazı yardımcı maddelerde eklenerek formülasyon denilen karışımlar elde edilmektedir. Bu sayede toksik olan aktif maddeler hem insanlar hem de çevre için daha az zararlı hale getirilmeye çalışılmaktadır. İlaç formülasyonlarında;

- a) Aktif madde veya etken madde,
- b) Yardımcı madde,
- c) Dolgu maddesi,
- d) Emilgätörler bulunmaktadır [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Toksik etki gösteren maddelerin pestisit olarak kullanılabilmesi için gereken şartlar aşağıdaki gibi olmalıdır:

- a) Stabil (Kararlı) olmalı,
- b) Tüketiciler, kullanıcılar ve diğer üçüncü kişiler için güvenilir olmalı,
- c) Besi hayvanlarına zarar vermemeli,
- d) Biyolojik açıdan aktif olmalı,

- e) Yabani canlılara ve faydalı organizmalara zarar vermemelidir [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Pestisit kullanımı özellikle gelişmiş ülkelerde fazladır. Ancak bu ülkelerde son dönemlerde “düşük riskli pestisitler-doğa dostu pestisitler” kullanılmaktadır [EPA, 1999]. Ayrıca Avrupa Birliği (AB) ülkeleri Tarım Ürünleri Çalışma Grubu, Avrupa Tarım Uygulamaları (EUROGAP) Protokolünü yürürlüğe koymuşlardır. Böylece satışa sunulan ürünler sonucu oluşabilecek zararların önlenmesi garanti ve güvencesinin sağlanması mümkün olacaktır [Anonim, 2004].

Türkiye’de de tarımda verimi artırmak için pestisit kullanımı her geçen gün artmaktadır. Türkiye genelinde 2003-2004 yıllarında ilaç ithalatının toplam kimyasal madde ithalatına oranı yaklaşık on binde 2 iken, bu oran 2005 yılında on binde 6’ya yükselmiştir [www.kkgm.gov.tr, 2008].

Kullanımdaki artışın yanı sıra bazı pestisitlerin olumsuz etkileri nedeniyle kullanımının yasaklandığı veya sınırlandırıldığı durumlarda mevcuttur. Örneğin araştırmamızda genotoksik etkilerini incelediğimiz Phorate insektisitinin 2002 yılından itibaren ABD’de kullanımı kısıtlandığı halde aynı yıl itibari ile Türkiye’de kullanım sırasında birinci sırada olduğu bilinmektedir [Delen ve ark., 2005].

2.3. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Tarım alanında kullanılan pestisitler etkiledikleri canlı grubuna göre sınıflara ayrılmaktadır:

- a) İnsektisitler [Böcek öldürücüler]
- b) Herbisitler [Yabani ot öldürücüler]
- c) Fungisitler [Mantar öldürücüler]
- d) Akarisitler [Örümcekleri öldürenler]
- e) Rodentisitler [Kemirgenleri öldürenler]
- f) Mollusitler [Salyangozları öldürenler]
- g) Nematisitler [Nematodları öldürenler]
- h) Afisitler [Yaprak bitlerini öldürenler]

- i) Avisitler [Kuşları öldüren veya kaçıranlar]
- j) Algisitler [Algleri öldürenler]
- k) Bakterisitler [Bakterileri öldürenler]
- l) Repellent [Kaçırma amaçlı]
- m) Fungostatik [Mantar faaliyetini durduranlar] [Güler ve Çobanoğlu, 1997].

Çalışmalarımızda kullandığımız iki kimyasalda insektisitler sınıfında yer almaktadır.

2.4. İnsektisitler

Formülasyonlarına göre insektisitler beş gruba ayrılmaktadır:

2.4.1. Organik fosforlular (Organofosfatlı insektisitler)

Fosforik asit türevleridirler. Stabil değildirler. Çabuk parçalanırlar ve toksisiteleri yüksektir. Organofosfatlı insektisitlerin en önemli özellikleri asetil kolin gibi davranarak asetilkolin esteraz ile etkileşime girmeleridir [Yavuz ve Şanlı, 1999].

II. Dünya Savaşı sırasında Alman müttefikler silah yapmak amacıyla organofosfatlı bileşikler kullanmışlardır. Sinir gazı olarak adlandırılan bu kimyasallar tanklarla atılabilecek duruma getirilmiştir. Sarin, Tabun ve Soman en iyi bilinen örnekleridir. Sonraki yıllarda ise Gerhard Schrader tarımda kullanılmak üzere organofosfatlı bileşikler bulmuştur [O'Brien, 1974].

Genel olarak triester olup fosforik asit (H_2PO_4) türevlidirler. Etkin maddelerinin içinde P (Fosfor) atomu bulunmaktadır. Çoğunlukla alkoksil içeren iki ester grubuna rağmen P atomuna ya metoksi (OCH_3) ya da etoksi (OC_2H_5) bağlanmıştır. Üçüncü ester grubuna ise elektron çekme özelliği olan ve P atomunun elektrofiliğini artıran oldukça kompleks (alifatik, homosiklik veya heterosiklik) yapılar gelebilir. Genelde üçüncü grup P atomuna ester (P-O-X) ya da tiyoester (P-S-X) bağlarıyla bağlanırken nadiren de olsa doğrudan C (Karbon) atomu da bağlanabilir. Bu yapıya örnek Trichlorfon verilebilir. Bu sayede P pozitif özellik kazanarak elektrofilik bir

yapı oluşur [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Etki mekanizması şu şekildedir:

Alınan herhangi bir uyarının sinir sistemine taşınması görevi asetilkoline aittir. Asetilkolin taşıyıcılık yaptıktan sonra asetik asit ve koline hidroliz olur. Bu sayede sinir sistemi yeni bir uyarıya hazır hale getirilmiş olur. Bu hidroliz olayını ise asetilkolin esteraz yapmaktadır. Deri, sindirim ve solunum gibi yollarla vücuda giren organofosfatlı insektisitler hedef enzim özelliğindeki asetilkolin esteraz ile yapısal bütünleşmeye yatkındırlar. Aslında organofosfatlı insektisitler asetilkolini taklit ederek asetilkolin esterazın substratı gibi davranırlar. Böylece bu enzimi kendilerine bağlayarak enzimin faaliyetini durdururlar. Asetilkolin parçalanamadığı için sinapslarda asetilkolin birikimi artar ve sinirsel iletim durur [Koçak ve ark., 2005; T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005]. Sonuçta “asetilkolin zehirlenmesi” denilen olay görülür. Asetilkolin artışı vücutta birçok olumsuz sonuçlar doğurur. Parasempatik sistemin aşırı çalışması, çizgili kas kasılması, kaslarda hissizlik, felç ve kalbin uyarılmasına bağlı kan basıncının artışı gözlenir [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

İnsan dokularında bulunan iki çeşit kolin esteraz enzimi farklı yerlerde farklı görevlerde kullanılmaktadır. Asetilkolin esteraz sinir iletimi ve/veya kas kasılması için asetilkolin yıkımını gerçekleştirirken, bütirilkolin esterazın ise görevi tam anlaşılmasa da miyorelaksan olarak kullanılan süksinil kolinin yıkımından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca asetilkolin esteraz sinir hücresi uçlarında, akciğerde, dalakda, beyin gri maddesinde ve eritrositlerde bulunurken bütirilkolin esteraz beyin ak maddesinde, pankreasta, karaciğerde, kalpte ve plazmada bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların organofosfatlı bileşiklerin her iki enzimi de inhibe ettiği gözlenmiştir. Organofosfatlı esterlerin ve karbamatların etkilerini belirlemek için kolinesteraz enzimleri ölçülür. Bütirilkolin esteraz, asetilkolin esteraza oranla inhibitörlere daha hassastır [Lotti, 1995; Zeren ve ark., 1998].

2.4.2. Karbamathılar

Karbamik asit esterleri olan bu grup organofosfatlı insektisitlere oranla daha küçük bir sınıf oluşturur. 1865 yılında *Calabar* fasülyesinden izole edilmiştir. 1925 yılında yapısı tespit edilmiş ve 1935 yılında da sentezi yapılmıştır [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Etki mekanizmaları organofosfatlılara benzer. İkisi de asetilkolin esterazı etkilemektedirler. Fakat organofosfatlı insektisitlerde P atomu enzim yapısına katılırken, karbamatlı insektisitler inhibitör olarak davrandıklarından bu aşama karbamatlama reaksiyonu olarak adlandırılır. Bu sayede organofosfatlı insektisitlere direnç kazanan zararlılara karbamatlı insektisitler etki edebilmektedir [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Karbamatlar, bazı özellikleri yönüyle organofosfatlılara benzerler. Fakat aralarında iki önemli farklılık bulunmaktadır. Aralarındaki ilk fark asetil kolinesteraz enziminin anyonik kısmı ile kompleks oluşturabilen bazik özellikte bir azot grubu taşımalarıdır. Ancak organofosfatlı insektisitler kesinlikle bazik pH'lı olamamaktadır. Böyle bir durumda iyonize olabilecekleri için böceklerin kutikulasına ve sinirlerin kılıfına geçiş yetenekleri önemli derecede azalma göstermektedir. İkinci önemli fark ise, kolinesteraz inhibisyonu esasına dayanan etkilerinin hızlı şekilde geri dönüşümlü olmasıdır [Yavuz ve Şanlı, 1999].

2.4.3. Piretroitler

Pyrethrum cinsi çiçeklerin öğütülmesiyle piretrum ekstraktı (% 1-2 piretrins tozu içermektedir) elde edilmiştir. Bu tozun insektisit etkisi ilk olarak 1880'li yıllarda tespit edilmiştir. Lipofilik olup, suda çözünürlükleri ve buharlaşma basınçları düşüktür. Toksisiteleri yüksektir [Ünal ve Gürkan, 2001]. Piretrum ekstraktının içinde piretrin I (Tip I; insektisit özelliği yüksek) ve piretrin II (Tip II; kısa sürede böceği sersemletme özelliği yüksek) maddeleri %73'lük kısmı oluşturmaktadır. Tip I piretroitleri sinirsel boşalmlarla kendini gösterir, ısıyla ters ilişkili olan sinirsel uyarılara yol açarlar. Tip I piretroitler DDT'ye benzer biçimde etki oluşturdukları

tesbit edilmiştir. Tip II piretroitler sinirsel iletimi engelleyici etki gösterirler ve ısı ile orantılı olarak öldürücü etkileri vardır. Tip I piretroitler Ca-ATP'azı Tip II piretroitlerden daha etkin bir şekilde inhibe ederler [Yavuz ve Şanlı, 1999; T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Piretroit'lerin birçok avantajı vardır. Bunların arasında en önemlileri;

- a) Geniş spektrumludurlar.
- b) Memelilere zehir etkileri çok azdır.
- c) Kısa sürede dekompoze olmaktadır.

Dezavantajları arasında ise;

- a) Kolay bozulurlar.
- b) Üretim maliyeti yüksektir.
- c) Üretimin sürekli olmasında zorluklar vardır.

Bu dezavantajlardan dolayı sentetik üretime yönelinilmiştir. Organofosfatlı insektisitlere göre yapılarında birçok asimetric merkez bulunur. Yapılarında bulunan bu asimetric merkezlerin insektisitliğe etkilerinin belirlenememesi ve stereoizomerizm özelliklerinin olması sentetiklerinin üretilmesini oldukça zorlaştırmaktadır [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Etki mekanizmaları şu şekildedir;

Sinir sisteminde aksonlardaki iletme etki ederler. Sinir hücrelerinin membranlarında bulunan Na (Sodyum) kanallarının açık kalmasını sağladıkları düşünülmektedir [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

2.4.4. Klorlanmış hidrokarbonlar

1940'lı yıllarda böcek öldürücü olarak kullanırken şu anda önemini kaybetmiştir. Cyclodiene sınıfı üyelerinden bazıları II. Dünya Savaşı'ndan sonra kullanılmaya başlanmıştır. En önemli özellikleri çeşitli doymamış bileşiklerin hexachlorocyclopentadiene (heksaklorosiklopentadien) ile reaksiyona girmesi sonucu yoğunlaştırılmış Cl (Klor) halkaları içermeleridir [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Tümü hidrojen, klor ve karbon içerir. Yağda çözünürlükleri ve kimyasal stabiliteleri oldukça yüksektir. Yıkımları yavaştır. Ekonomik açıdan düşük fiyatlı olmaları, insanlara nispeten az toksik oluşları avantajlı görünmelerine sebep olmuştur. Vücut yağ dokusunda birikme özelliğindedirler. Bu tür besin ile beslenen türlerde, ölüm veya fizyolojik bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca pestisitlerin ikinci derecede konsantrasyon olduğu canlıyı yiyen diğer türler de bundan etkilenmektedirler [<http://www.agri.ankara.edu.tr/irrigation>, 2009]. Zararlı etkilerinin sonucu T.C. Tarım Köyişleri Bakanlığı tarafından yasaklanmış bir gruptur [Kaya ve ark., 1998].

Etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Fakat GABA (gamma-aminobutric acid) reseptörlerinin işlevini engellemektedirler. GABA'nın görevi nöronlardaki Cl iyon geçirgenliğini düzenlemektir. Dokularda organik klorlu bileşiklerin birikmesi sinir sistemine zarar verir ve aritmi oluşmasını sağlar [T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı, 2005].

Kuşlar başta olmak üzere birçok canlıda böbrek, karaciğer, sinir sistemi gibi dokularda pestisit birikimine bağlı ölümlere sebep oldukları belirlenmiştir. Ölümle sonuçlanmayan durumlarda ise üreme sisteminde toksik etki göstermişlerdir [Preziosi, 1998; European Commission, 1999].

2.4.5. Diğer kimyasal sınıflar

Böcek gelişim engelleyicileri (IDI) ve böcek gelişim düzenleyicileri (IGR) seçicilikleri ve özel etki şekilleri ile son zamanlarda adından söz ettirmektedir. Böceklerin vücutlarından salgıladıkları ve kendi gelişimlerini tamamlamak için ihtiyaç duydukları bu bileşikler sayesinde böceklerin doğal hormon dengelerini bozmak koşuluyla böceklerin, büyüme ve gelişmeleri engellenerek verdikleri zararların önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Böcek büyüme düzenleyicilere en iyi iki örnek juvenil hormon ve benzoyleurea türevleridir [Dursun ve ark., 2008]. Benzoyleurea türevlerinden olan ve böceklerde kitin oluşumunu engelleyerek veya larvaların gömlek değiştirmesini önleyerek ölümlerine sebep olan diflubenzuran en yaygın bilinenlerdendir [Zeki ve ark., 1999]. Aynı şekilde kitin oluşumunu engelleyen cyromazin'in hücre turgor basıncını artırdığı ve kutikuladaki keselerin su ile dolmasını sağlayarak lezyon oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir [Ünal ve Gürkan, 2001].

Araştırmamızda organofosfatlı bileşikler sınıfında bulunan iki insektisit kullanılmıştır.

2.5. Mutajenite Testleri

Günümüzde kimyasal madde kullanımının her alanda hızla artması sonucunda bu kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyona sebep olup olmadıkları son derece önem kazanmıştır. Kimyasal maddelerin mutajenik, karsinojenik etkilerinin belirlenmesi için deney hayvanlarındaki tümör oluşumları tespit edilmektedir. Bu testlerde deneyin başlaması ile deneyin sonuçlanması arasında uzun bir süre geçtiği için bunlara uzun süreli testler denilmiştir. Yalnız uzun süreli testler maliyet açısından oldukça pahalı olmalarından dolayı araştırmacılar kısa zamanda sonuç veren, düşük maliyetli testleri geliştirmişlerdir [Akın, 1990; Sarıkaya, 2005].

Yaygın olarak kullanılan kısa süreli mutajenite testlerinden biri Ames testidir. Ames testi bakterilerde uygulanan ve en çok bilinen mutajenite testlerindedir. Genotoksik

ve kanserojenik etkinin araştırılmasında *Salmonella tyriphimirium* kullanılarak uygulanmaktadır. Hem fazla masraflı olmaması hem de kimyasalların farklı dozları için uygulanabildiğinden caziptir [Çelik, 2003]. Denede histidin bağımlı *Salmonella* suşları kullanılmaktadır. Bu metotta önce bakterilerin onarım mekanizması etkisiz hale getirilerek bir aminoasite bağımlı hale getirilir. Daha sonra da bakteri bir maddeye maruz bırakılarak mutajenite etkileri incelenmektedir [Ames ve ark., 1975; Gürsoy, 2001]. *Salmonella* mutasyon testi, ayrıca potansiyel kimyasalların kanserojen olup olmadıklarını kısa sürede ortaya koyan bir metoddur [Moran ve Ames, 1983; Johnson, 2003].

Kısa süreli genotoksik testlerden bir diğeri de *Allium* testidir. Bitkilerde uygulanan bu test hızlı ve hassas bir testtir. Bitkilerin kullanılmasının bir başka sebebi de bitkilerin kolay elde edilebilmeleri, ucuz olmaları, kromozomlarının az ve büyük olması ve köklerinin toprakta bulunan kimyasallarla doğrudan etkileşim halinde olmalarıdır. Aynı zamanda bitkiler insan ve diğeri canlıların besin kaynağıdır. *Allium* testinde *Allium sativum*, *Allium cepa* ve *Vicia faba* en çok kullanılan bitkilerdendir [Duhova, 1993; Helvacı, 2003]. *Allium* testini ilk kez 1938 yılında Levan kullanmış daha sonra da Fiskesjö bu metodu değişik kimyasalların toksisitesinin belirlenmesinde standart bir metod olarak kullanmaya başlamıştır [Fiskesjö, 1985; Rank ve Nielson, 1993].

In vivo testlerden biri olan ve *Drosophila* ile yapılan eşeye bağımlı letalite testi de tercih edilen testlerdendir. Bu test sayesinde eşey hücrelerindeki mutasyonlar ve kromozomal anormallikler tespit edilmektedir [Kilbey ve ark., 1984; Sarıkaya, 2005]. *Drosophila* ile yapılan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile de mutasyon etkileri fenotipte belirlenebilmektedir. Bu yöntem ayrıca ucuz ve kolay bir yöntemdir [Frölich ve Würzler, 1990; Falakalı, 1990; Sarıkaya, 2005].

Kısa süreli genotoksik testlerinden olan ve en hassas yöntemler arasında kabul edilen testler periferik kan lenfositlerinde uygulanan kromozom anormalliği testi (KA), kardeş kromatid değişimi testi (KKD), mikronükleus testi (MN)'dir. Son yıllarda comet testi de güvenilir bir test metodu olarak kullanılmaktadır.

1975 yılında Perry ve Evans mutajen ve kanserojen etkileri bilinen maddelerin Çin Hamsteri Ovaryum (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamışlardır [Perry ve Evans, 1975]. 1978 yılında ise Carrano ve arkadaşları mutajen ve kansinojenik özellikleri olan kimyasalların toksik dozlarının oluşturduğu genetik hasarların KKD ve KA analizleri ile saptanabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca kimyasalların mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumu arasında paralel bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. İlerleyen yıllarda da bu testler mutajenite ve kanserojenlerin etkilerini belirlemede kullanılmaya devam edilmiştir [Parlak, 2007].

MN testi de genotoksisite çalışmalarında sıkça kullanılan testlerden biridir. Bu testte hücre bölünmesi sırasında asentrik kromozom fragmentleri veya kalgın kromozomlar mikronükleus denilen ana çekirdekten ayrı bir yapı oluştururlar. Bunun için MN hem hızlı hem de güvenilir bir test olarak kabul edilmektedir [Fenech, 2000].

Son zamanlarda sıkça kullanılan bir diğer yöntem de DNA hasarlarını belirlemeye yardımcı olan Comet (Tek Hücre Jel Elektroforezi= Single Cell Gel Electrophoresis= SCGE) testidir. DNA'da kimyasallar sonucu oluşan genotoksisiteyi hızlı, basit ve duyarlı bir şekilde tespit etmek için kullanılan bir methoddur [McKelvey-Martin ve ark., 1993].

2.5.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

In vitro mutajenite testlerinden sıkça kullanılan bir methoddur. Bu methodda mitotik metafaz safhasında bulunan kromozomlardaki hasarlar değerlendirilmektedir. Kültüre alınmış periferel kan hücrelerinde meydana gelen kromozomal anormalliklerin frekansının aynı zamanda da şüphelenilen ve kesin emin olunan genotoksik maruziyet ve/veya bu maruziyetin sebep olduğu biyolojik etkilerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Genetik hasarların boyutlarını saptamaktadır [Çakmak, 2000].

Kromozom anormallikleri uzun süre genotoksik ajanlara maruz kalmış insanların bu maddelerden nasıl etkilendiklerini belirlemek için kullanılan en iyi yöntemlerdendir.

Yapılan çalışmalarla araştırmacılar insan periferel lenfositlerindeki kromozom anormallikleri frekansı ile kanser oluşumu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirlemişlerdir [Natarajan, 2002; Bolognesi, 2003; Ji ve ark., 2001; Shukla ve ark., 2001].

Bazı toksik ajanlar DNA'daki fosfodiester bağlarını kopararak S safhasında bu hatanın devamını yani yanlış DNA replikasyonu oluşmasını sağlamaktadır. Bu da mutajenlerin kromozomlarda anormallik oluşmasına sebep olmaktadır [Galloway ve Wolff, 1979; Kimura ve ark., 1985].

Kromozomlarda gözlenen kromatid kırıkları, kromozom kırıkları, fragment oluşumları, disentrik ve halka kromozomlar, kardeş kromatidlerde birleşmeler, translokasyon, inversiyon ve izokromozomlar yapısal anormalliklerdir. Poliploidi ise sayısal anormalliktir. Gap bazı araştırıcılar tarafından anormallik olarak kabul edilmemektedir. Bu bölgelerin DNA'daki spiral çözülme sonucu oluştuğu ve bu nedenle de boyanmayan kromozom bölgeleri oldukları açıklanmıştır [Dean ve Danford, 1984; Brusick, 1987; Natarajan, 2002; Mateuca ve ark., 2006].

Kromatid kırığı kromozomun bir kolundaki DNA çift zincirinin kırılması sonucu oluşmaktadır. Kromozom kırığında ise kromozomun her iki kolunda DNA çift zincirinde kırılma vardır. Eğer kimyasala maruziyet G1 safhasında olursa kromozom tipi anormallikler, G2 safhasında olursa kromatid tipi anormallikler, eğer S safhasında olursa da her iki tip anormallik ortaya çıkmaktadır [Natarajan ve Obe, 1982].

Asentrik fragmentler kromozomda terminal delesyonlar sonucu oluşabilmektedir. Kromozomun iki kromatidinde de kırılma olursa kardeş kromatidlerde birleşme meydana gelebilmektedir. Ayrıca yakın kromozomlardaki kırıklar farklı şekillerde birleşebilmekte böylece translokasyonlar, disentrik kromozomlar veya inversiyonlar ortaya çıkmaktadır. Daha kompleks düzenlemeler ile halka kromozomlar da oluşabilmektedir [Çakmak, 2000; Muranlı, 2006].

2.5.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kimyasal mutajen ve kanserojenlerin etkilerinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer *in vitro* sitogenetik metod ise kardeş kromatid değişimi (KKD) metodudur. KKD bir kromozoma ait kromatidlerin karşılıklı bölgelerinin kopup yer değiştirmesi daha sonra da bu parçaların tekrar birleşmesi sonucu oluşmaktadır [Sardaş ve Karakaya, 1990].

İlk kez 1938’de McClintock tarafından keşfedilmiştir [Raposo ve ark., 2004]. Taylor 1958 yılında bitki hücrelerinde otoradyografik yöntem ile yaptığı çalışmalarda kromozomların replikasyon sırasında kardeş kromatidlerde değişmelerin meydana geldiğini gözlemiştir [Taylor, 1958]. Bunların arkalarında bıraktıkları işaretler ile onları saptayabilmenin mümkün olduğunu göstermiştir. Bu yöntemde kromozomlar işaretli timin varlığında birinci mitozda bir defa kendilerini eşlemelerine izin verilmiş, ikinci replikasyonda ise izotop bulunmayan ortamda kendini eşlemeye bırakılmıştır. Daha sonra DNA’nın kendini yarı korunumlu (semikonservatif) eşlemesi sonucu her kromozoma ait sadece bir kromatidin işaretlendiği görülmüştür. Çalışmanın sonunda kardeş kromatidler arasındaki simetrik değişime Taylor “kardeş kromatid değişimi” adını vermiştir [Perry ve Thomson,1984].

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda timin analogu gibi davranan 5-Bromo-deoxyuridin (BrdU) kullanılmıştır. BrdU iki replikasyon döngüsüne girecek kültür ortamına eklenmiştir [Natarajan, 2002]. BrdU, DNA replikasyonu sırasında semikonservatif sentez mekanizmasına göre yeni sentezlenen polinükleotid zincirinde timinin yerini alacaktır. Daha sonra bu hücreler flöresan ışık altında bekletilip, Giemsa ile boyanarak görünür hale gelmeleri sağlanmıştır [Natarajan, 2002]. BrdU bulunan bölgeler açık, bulunmayan bölgeler ise koyu boyanmaktadır. Bu boyamadaki farklılıklar DNA’da kardeş kromatidler arasında homolog olan parçalar arasındaki değişimleri göstermektedir. KKD yöntemi de DNA hasarlarının belirlenmesinde kullanılan hassas testlerden biridir [Palitti ve ark., 1982; Aksoy ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008].

2.5.3. Mikronükleus (MN) testi

Çeşitli kimyasalların ve fiziksel ajanların, sebep oldukları anöjenik ve klastojenik etkileri belirlemede kullanılan yöntemlerden biridir [Kirsch-Volders ve ark., 1997; Cicchetti ve ark., 1999]. Mikronükleuslar mitoz bölünme sırasında hücredeki asıl çekirdek dışında anafaz evresinde kutuplara çekilemeyen kalgın kromozomlar veya asentrik kromozomların fragmentlerinden meydana gelen oluşumlardır [Ford ve ark., 1988; Vanderkerken ve ark., 1989; Vanparys ve ark., 1990; Zijno ve ark., 1994].

MN yönteminde hücrelerde sitokinez durdurularak MN oluşumu gözlemlenir. İlk defa Howell tarafından 1886 yılında anemik kedilerin eritrositlerdeki gözlemleriyle tespit edilmiştir. Daha sonrada Jolly (1907) Howell'in çalışmalarını doğrulamıştır. MN'ler bunun için hematolojide "Howell-Jolly Cisimleri" olarak adlandırılırlar [Anwar ve ark., 1994; Çakmak, 2000]. Bu çalışmalardan sonra benzer yapılar Brenneke (1937) tarafından fare ve sıçan embriyolarında, Thoday (1951) tarafından *Vicia faba*'da gözlenmiştir [Kirsch-Volders ve ark., 2003].

1959 yılında Evans ve arkadaşları *Vicia faba* kök uçlarında gözlemledikleri MN'lerin asentrik fragmentlerden meydana geldiklerini ve mitozun son evresinde yavru çekirdeklerden ayrılarak oluştuklarını belirlemişlerdir [Evans ve ark., 1959]. Boller ve Schmid 1970'de, Heddle 1973'de kimyasalların genotoksik etkilerini belirlemede kemik iliği eritrositlerinde MN oluşumlarını değerlendirmişlerdir [Boller ve Schmid, 1970; Heddle, 1973]. Daha sonraki yıllarda Countryman ve Heddle bu yöntemi kültüre ettikleri insan lenfositlerinde kimyasal karsinogenleri belirleme amacıyla kullanmaya başlamışlardır [Countryman ve Heddle, 1976].

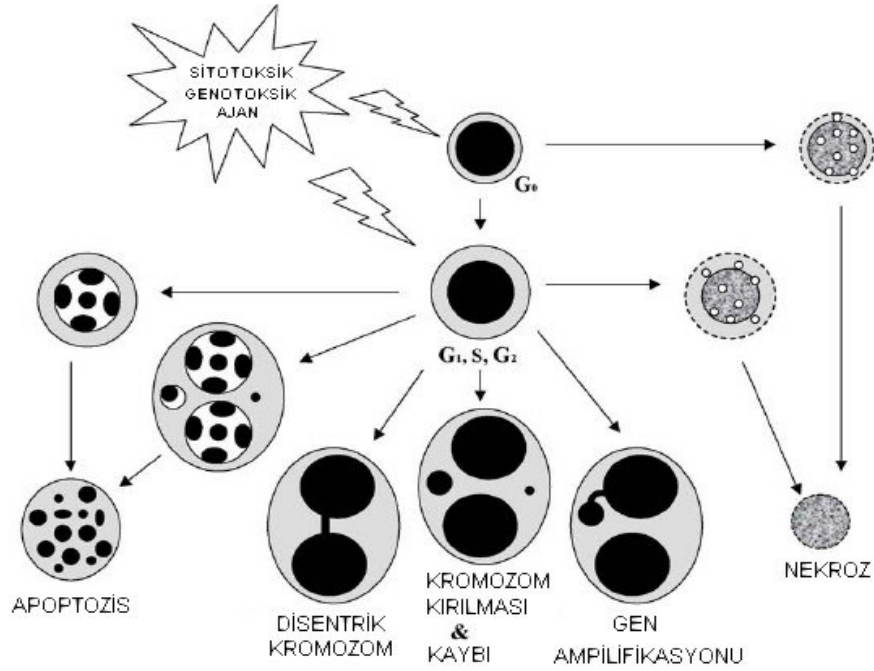
MN'ler mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken iğ ipliklerine bağlanamayan kromozomlar ve asentrik elementlere yol açan klastojenik aktivite sonucu ortaya çıkarlar. Bu element ve kromozomlar hücre bölünmesi sonunda bir hücre içinde (aynı sitoplazmada) esas hücre çekirdeğinden ayrı bir yapı oluştururlar [Falck ve ark., 1997; Fenech, 2000]. Fenech ve Morley 1985'te yaptıkları çalışmada hücre bölünmesi sırasında karyokinezin tamamlanmasını fakat sitokinezin sitokalasin

B (CytB) ile durdurulmasını sağlanmışlardır. CytB aktin polimeraz inhibitörü olan bir maddedir. Bu özelliği nedeniyle nükleer bölünmeyi durdurup binükleer hücreler oluşmasını sağlar [Fenech ve Morley, 1985; Falck ve ark., 1997; Çakmak, 2000]. Daha sonra bazı araştırmacılar klastojeniteye sebep olan kimyasallar ile anöploidiye sebep olan kimyasalların ayırt edilmesi için MN yönteminde bazı modifiye işlemlerden geçirmişlerdir. Oluşan MN büyüklüğüne bakılarak klastojenler ve anöjenler tespit edilmiştir. Küçük MN'lerin asentrik kromozom fragmenti içerdikleri ve klastojenlerce uyarıldıkları; büyük MN'lerin ise tam kromozom içerdikleri ve anöjenlerce uyarıldıklarını belirtmişlerdir [Countryman ve Heddle, 1976; Högstedt ve Karlsson, 1985].

Mikronükleus değerlendirilmesinde kullanılan ölçütler;

- a) Esas çekirdek ile aynı yapıya sahip olmalıdırlar,
- b) Çapları esas çekirdeğin 1/3'ü ile 1/16'sı arasında bir büyüklükte olmalıdır.
- c) Binükleat hücre içinde yer almalıdır.
- d) Hücrenin sitoplazma sınırları belirgin olmalıdır.
- e) Ana çekirdeğe nükleoplazmik köprü ile bağlı olmamalıdır.
- f) Esas çekirdekten ayrı oval veya yuvarlak olmalıdır.
- g) Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtmamalıdır. Asıl çekirdekle aynı renkte gözlenmelidir [Fenech, 1993].

Günümüzde yapılan çalışmalarda bazı genotoksik ve sitotoksik ajanların, kromozom kırılması ve kaybına, disentrik kromozom oluşumuna, gen amplifikasyonlarına (nükleoplazmik köprüler), nekrosis ve apoptosise sebep oldukları tespit edilmiştir. Bu hasarların ölçümlerinin yapılmasında MN yöntemi kullanılmaktadır (Şekil 2.1.) [Fenech, 2006].



Şekil 2.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz [Fenech, 2006'dan]

2.5.4. Comet testi

Çeşitli kimyasal ajanların DNA'daki klastojenik etkilerini belirlemek için kolay ve hızlı uygulanabilen çeşitli *in vitro* yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemlerden birisi de tek hücre jel elektroforezi [Single Cell Gel electrophoresis (SCGE)=Microgel Electrophoresis Technique] veya comet [Comet=Kuyruklu Yıldız] testidir. DNA hasarı ve tamirini belirlemek için kullanılan bu yöntem hassas bir genotoksisite testidir [Singh ve ark., 1988; Fairbairn ve ark., 1995; Sasaki ve ark., 2002; Poletta ve ark., 2008]. Bu teknik DNA'daki tek zincir kırıklarını ve yine DNA'da tamamlanmamış tamir bölgelerini gösteren genetik toksikoloji testi olarak kabul edilmektedir [Ross ve ark.,1995; Tice ve ark., 2000; Sasaki ve ark., 2002].

1978 yılında ilk kez Rygberg ve Johanson canlı hücrelerde DNA sarmalındaki kırılmaları tespit etmişlerdir. Hafif alkali şartlarda DNA'nın ayrılmasına izin verip lam üzerinde agaroz gömülü olan hücreleri lize ederek proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra DNA nötralize edilmiş ve akrinin oranj kullanılarak DNA

boyanmıştır. Kırmızı (tek sarmal) ve yeşil (çift sarmal) flörsanların oranları tespit edilmiştir [Rydberg ve Johanson, 1978; Ünal, 1998]. 1984 yılında Ostling ve Johanson nötral tekniği modifiye etmiştir. Yaptıkları çalışmada agarozda gömülü hücreleri lam üzerine yayarak yüksek tuz ve deterjanla lize etmişlerdir. Daha sonra da bu hücreleri elektroforeze tabii tutmuşlardır. Bu basamaktan sonra akridin oranj ile boyanmışlardır. Elektroforezde hasarlı DNA'ların çekirdekten anoda doğru göç etmesini sağlamıştır. Hücreler bu göç sonunda kuyruklu yıldız görünümünün oluşumuna neden olmuştur. Tekniğin adı da bu görüntünün sonucunda verilmiştir. Nötral pH'daki bu uygulama sayesinde DNA çift zincir kırıkları belirlenebilmiştir [Ostling ve Johanson, 1984; Kassie ve ark., 2000].

DNA'da hasarlara sebep olan birçok ajanın çift zincirden çok DNA'nın tek zincirinde hasara sebep olması ve nötral şartlarda proteinlerin tam olarak uzaklaştırılmaması nedeniyle teknik 1998 yılında Singh ve arkadaşları tarafından alkali koşullarda yapılarak değiştirilmiştir [Ünal, 1998]. Hücreler agara gömüldükten sonra DNA sarmalının açılması ve hücrelerin lize olabilmesi için 1 saat bekletilmiştir. Elektroforez sırasında hasarlı DNA'lar anoda doğru göç ederler. Comet testi DNA'nın tek zincir kırıklarının DNA çapraz bağlarının ve tamamlanmamış ekzisyon tamir bölgelerindeki hasarların da belirlenmesinde kullanılmaktadır [Singh ve ark., 1988].

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

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

Comet tekniği diğer sitogenetik tekniklerden daha avantajlıdır. Bu avantajlar;

- a) Daha az sayıda hücre gerektirmesi,
- b) Değişik hücre ve dokulara uygulanabilmesi (Şekil 2.2),
- c) Hassas, hızlı ve güvenilir olması,
- d) Her türlü ökaryotik hücreye uygulanabilir olması (Şekil 2.3),
- e) Hücredeki DNA kırıklarının görsel olarak belirlenmesini sağlamasıdır [Singh ve ark., 1988; Fairbairn ve ark., 1995; Ünal, 1998; Kassie ve ark., 2000; Tice ve ark., 2000].

Kültür

İnsan Hücre Kültürü

- Fibroblast
- Glioma
- Kan
- Karsinoma
- Melanoma
- Meme keratinositleri

Hayvan Hücre Kültürü

- Fare (FO, L5178Y)
- Hamster (CHO, HIT T15, V-79)

Şekil 2.2. Comet tekniği kullanılarak hazırlanan kültür çeşitleri [Ünal, 1998'den]

Doku

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

Şekil 2.3. Comet tekniği kullanılarak incelenebilecek hücre tipleri [Ünal, 1998'den]

2.6. Trichlorfon'un Canlılar Üzerine Etkileri

Trichlorfon hafif alkali şartlarda bir klor atomu kaybederek kendisinden son derece etkili Dichlorvos (asetilkolin esterase etkinliğini 100 kez daha güçlü şekilde engeller) çevrilen, fosfonat türevi bir maddedir. Bu durum böceklerin vücudunda da oluşur; Trichlorfon aslında Dichlorvosun ön maddesidir. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'ne göre Dichlorvos Ib (Zehirli) sınıfında yer alırken Trichlorfon II. (orta-derecede zehirli) sınıfta yer almaktadır [Kaya, 2002].

Trichlorfon çevrede hızla parçalanma özelliğine sahiptir. Aerobik topraklarda yarılanma ömrü 3-27 gün arasında değişmektedir. Parçalanma ürünlerinden biri dichlorvostur. Suda kolay çözünür ve toprağa bağlanması zayıftır, bunun için çevrede kolaylıkla yayılabilmek özelliğine sahiptir. Bunun sonucunda yer altı sularını kirletme özelliğine sahiptir. Alkali sularda hızlı bir şekilde yıkılır [Kaya, 2002].

Ayrıca Trichlorfon'un; annenin bu kimyasala maruz kalması sonucunda teratojenik etkisi olabileceği belirlenmiştir [Kaya, 2002].

Trichlorfon'un farklı yöntemlerle bazı canlılarda gözlenen LD₅₀ değerleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Trichlorfon'un çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Sıçan(Rat)	Oral	390-630 mg/kg
Fare	Oral	300-860 mg/kg
Tavşan	Oral	160 mg/kg
Tavşan	Dermal	2000 mg/kg
Sıçan(Rat)	Dermal	2000 mg/kg

Trichlorfon'un canlılara etkisi ve özellikle de genotoksik etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu genotoksik etkiyi göstermektedir (Çizelge 2.2). İnsan lenfositleri ile yapılan bir çalışmada Trichlorfon'un 20, 30, 40, 50 ve 60 µg/ml'lik dozları 24 saatlik sürede kullanılmıştır. KKD oranında doza bağlı olmayan bir artış ve Rİ'de önemli oranda düşüş gözlenmiştir [Madrigal-Bujaidar ve ark., 1993]. Yine Trichlorfon'un da aralarında bulunduğu yedi farklı insektisite maruz kalan insanların lenfositlerinde sayısal ve yapısal kromozom anormalliklerinde önemli artış belirlenmiştir [Czeizel, 1994]. Wang ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada aralarında Trichlorfon'un da bulunduğu beş farklı insektisitlerden oluşan Methoxyphosphinyl'in bileşenlerinin genotoksisitelelerini belirlemişlerdir. KKD frekansında istatistiksel olarak önemli

artıŖa sebep olmuŖtur. KA frekansında ise Trichlorfon'un KA'da artıŖa sebep olmadığı belirlenmiŖtir [Wang ve ark., 2003].

Çizelge 2.2. Trichlorfon insektisiti ile yapılan genotoksik araştırmalar [Bir bölümü Ronaldi ve ark., 2008'den]

Biyolojik Hedef	Genotoksisite Göstergeleri	Açıklamalar	Etkiler	Referans
<i>In vitro</i>				
Hamster hücreleri	KKD ve hücre döngüsünün engellenmesi	Hücre döngüsünün engelleme	Pozitif	Chen ve ark., 1981
İnsan fibroblastları	Proglamlanmamış DNA sentezi	KKD'de doza bağlı artış	Pozitif	Waters ve ark., 1982
Fare lenfoma hücreleri	Gen mutasyonları	Önemli artış	Pozitif	McGregor ve ark., 1988
İnsan lenfositleri	KKD ve hücre döngüsünün engellenmesi	Önemli artış	Pozitif	Madrigal-Bujaidar ve ark., 1993
İnsan lenfoblastoid hücreleri	MN ve kromozom yapısı	Doza bağlı olmayan önemli KKD artışı ve Rİ'de önemli azalış	Pozitif	Doherty ve ark., 1996
Fare oositleri	İğ ipliği morfolojisi, kromozom yapısı ve hücrelerin olgunlaşması	Kromozomlarda ayrılmama ve MN'de doza bağlı artış	Pozitif	Yin ve ark., 1998; Sun ve ark., 2008
Hamster hücreleri	İğ ipliklerinde bozulma	Mayotik ayrılmamada artış, hiperploid ve poliploid oositlerde ve metafaz II'de iğ ipliği anormalliginde önemli artış	Pozitif	Sun ve ark., 2000
<i>In vivo</i>				
İnsan lenfositleri	KA	Mitoz bölümmede doza bağlı artış	Pozitif	Van Bao ve ark., 1974; Czeizel, 1994

Çizelge 2.2. (Devam). Trichlorfon insektisiti ile yapılan genotoksik araştırmalar [Bir bölümü Ronaldi ve ark., 2008'den]

Biyolojik Hedef	Genotoksisite Göstergeleri	Açıklamalar	Etkiler	Referans
Fare testis hücreleri	Dominant letal mutasyonlar	Tek bir dozdan sonra implantasyon sonrası kayıplarda önemli artış	Pozitif	Dedek ve ark., 1975
Fare testis hücreleri	Spermatogonia ve 1. spermatositlerde KA, dominant letal mutasyonlar	Kronik muameleden sonra tek doz kullanılmış ve önemli bir etki belirlenmemiştir	Negatif	Moutschen-Dahmen ve ark., 1981; Degraeve ve ark., 1985
Fare kemik iliği	KA	Kronik muameleden sonra tek doz kullanılmış ve önemli bir etki belirlenmemiştir	Negatif	Moutschen-Dahmen ve ark., 1981; Degraeve ve ark., 1985
Suriye hamster kemik iliği	KA	Önemli bir artış olmamıştır	Negatif	Dzwonkowska ve Hubner, 1986
Fare kemik iliği	KKD	En yüksek dozda önemli artış	Pozitif	Madrigal-Bujaidar ve ark., 1993
Fare zigotları	Sitogenetik ve gelişimsel etkiler	MN ve mozaik anöploidide ve gelişimsel gecikmede önemli artış	Pozitif	Tian ve ark., 2000
İnsan eşey hücreleri / insan fetüsleri	Doğuştan anomallikler	Trichlorfon kontamine olmuş yiyeceklerin alınmına bağlı yapsal anomallikler	Pozitif	Czeizel ve ark., 1993

Çizelge 2.2. (Devam). Trichlorfon insektisitisi ile yapılan genotoksik araştırmalar [Bir bölümü Ronaldi ve ark., 2008'den]

Biyolojik Hedef	Genotoksisite Göstergeleri	Açıklamalar	Etkiler	Referans
Fare sperm hücreleri	Kromozom yapısı	Disomik sperm artışı (Anöploidi)	Pozitif	Sun ve ark., 2000
Fare oositleri	İğ ipliği anormallikleri, kromozomal yapı ve olgunlaşma	İğ ipliği anormalliklerinde, hiperploid ve poliploid oositlerde ve mayotik ayrılmamada önemli artış	Pozitif	Sun ve ark., 2008
Fare oositleri		Metafaz II oositleri ve erken sentromer ayrılmalı metafaz II oositlerinde önemli azalma gözlenmiştir	Pozitif	Ronaldi ve ark., 2008
Fare oositleri		Metafaz II poliploid oositlerde ve metafaz II hiperploid oositlerde önemli bir değişim belirlenmemiştir	Negatif	Ronaldi ve ark., 2008
Fare kemik iliği	KA	Önemli artış	Pozitif	Nehez ve ark., 1987
Fare kemik iliği	Eritrositlerde MN	Önemli bir artış olmamıştır	Negatif	Waters ve ark., 1982

2.7. Phorate'ın Canlılar Üzerine Etkileri

Organik çözücülerde çözünme özelliği olan Phorate normal şartlarda dayanıklı (>2 yıl) fosforodithioat türevi bir organofosfattır. Çevrede orta derecede kalıcı özelliğe sahiptir. Toprakta parçalanma yarı-ömrü ortalama 60 gündür. Suda güç çözüldüğü için ayrıca toprağa zayıf bağlandığı için çevredeki hareketi kolaydır. Asidik sularda yarılanma ömrü birkaç gün ile birkaç hafta arasında değişim göstermektedir. Alkali sularda bu süre daha da kısadır. Bitkilerde kalıcı olmamasına rağmen son derece etkin metabolitlere dönüşebilmektedir. Bu metabolitler arasında sülfoksit, sülfon gibi maddeler bulunmaktadır. Bu metabolitler bitkiye kökü aracılığıyla girer ve birkaç gün süreyle kalırlar. Phorate deri ve sindirim kanalından çabuk emilir. Vücutta kendisinden daha etkin olan metabolitlere çevrilebilir. Organofosfatlı insektisitler arasında memeliler için çok zehirli (Ia sınıfı) olan, sistemik etkili bir maddedir [Kaya, 2002].

Phorate'ın farklı yöntemlerle bazı canlılarda gözlenen LD₅₀ değerleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Phorate'ın çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Sıçan(Rat)	Oral	1-5 mg/kg
Fare	Oral	2.25-6.5 mg/kg
Sıçan(Rat)	Dermal	2.5-6.2 mg/kg
Tavşan	Dermal	5.2 mg/kg
Kobay	Dermal	20-30 mg/kg
Sıçan(Rat)	İnhalasyon	0.06 mg/kg

Phorate'ın genotoksisitesi ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Çizelge 2.4). Bunların büyük bir kısmı negatif çıkmıştır. Ancak pozitif olanlarda vardır. İnsan lenfositleri ile yapılmış çalışmalarda KKD oranını artırmadığı belirlenmiştir [Pandita ve Khoshoo, 1984; Wang ve ark., 1987].

Çizelge 2.4. Phorate insektisiti ile yapılan genotoksik araştırmalar [Bir bölümü Committee on Updating of Occupationally Exposure Limits, a committee of the Health Council of the Netherlands, 2003'den]

Biyolojik Hedef	Genotoksisite Göstergeleri	Açıklamalar	Etkiler	Referans
<i>In vitro</i> <i>S.typhimurium</i> ; TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538, <i>E. coli</i> p3478	Reverse mutasyon (Ames testi)	S9'un metabolik aktivasyon sistemi varken veya yokken herhangi bir değişim belirlenmemiştir	Negatif	Waters ve ark., 1980; Pandita, 1986; Simmon ve ark., 1987
İnsan lenfoid hücreleri	KKD	S9'un metabolik aktivasyonu olmadan	Pozitif	Sobti ve ark., 1982
İnsan lenfositleri	KKD	S9'un varlığında ve yokluğunda herhangi bir artış belirlenmemiştir	Negatif	Pandita ve Khoshoo 1984; Wang ve ark., 1987
CHO hücreleri	KKD	S9'un varlığında ve yokluğunda herhangi bir artış belirlenmemiştir	Negatif	Pandita ve Khoshoo 1984; Wang ve ark., 1987
Rat trakeal epitelial hücreler	KKD	S9'un varlığında ve yokluğunda herhangi bir artış belirlenmemiştir	Negatif	Pandita ve Khoshoo 1984; Wang ve ark., 1987

Çizelge 2.4. (Devam). Phorate insektisitini ile yapılan genotoksik araştırmalar [Bir bölümü Committee on Updating of Occupationally Exposure Limits, a committee of the Health Council of the Netherlands, 2003'den]

Biyolojik Hedef	Genotoksisite Göstergeleri	Açıklamalar	Etkiler	Referans
İnsan fibroblastları (WI-38 hücreleri)	Programlanmamış DNA sentezi	Herhangi bir değişim belirlenmemiştir	Negatif	Simmon ve ark., 1987
CHO kültüründe <i>hprt</i> lokus	Gen mutasyon	Önemli bir artış belirlenmemiştir	Negatif	Thilager ve Kumaroo, 1985
<i>S.cerevisiae</i> D3	Mitotik rekombinasyon	Metabolik aktivasyon varken veya yokken	Negatif	Simmon ve ark., 1987
CHO hücreleri	KA	S9 olmadan	Pozitif	Lin ve ark., 1987
<i>In vivo</i>				
Winstar ratları kemik iliği hücreleri	KA	Önemli artış belirlenmiştir	Pozitif	Grover ve Malhi, 1985; Malhi ve Grover, 1987
Swiss albino farelerin kemik iliği hücreleri	MN	Önemli bir artış belirlenmemiştir	Negatif	Pandita, 1986
Winstar ratları kemik iliği hücreleri	MN	Önemli artış belirlenmiştir	Pozitif	Grover ve Malhi, 1985; Malhi ve Grover, 1987
Winstar ratları kemik iliği hücreleri	KA ve MN	Önemli artış belirlenmiştir	Pozitif	Dhingra ve ark., 1990

2.8. Çeşitli Materyal ve Deney Sistemleriyle Yapılan Genotoksik Araştırmalar

Birçok araştırmacı tarafından pestisitlerle yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır.

Madrigal-Bujaidar ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)'in fare kemik iliği hücrelerinde ve fare spermatogonial hücrelerinde KKD frekansını artırıp artırmadığını incelemiştir. Oral olarak uygulanan 2,4-D'nin üç grup fare üzerinde 50; 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarının genotoksik etkileri araştırılmıştır. Somatik hücrelerde 100 ve 200 mg/kg'lık dozlar KKD frekansını doza bağlı olarak önemli oranda artırmıştır. Mİ ve hücre çoğalma kinetiğinde önemli bir etki belirlenmemiştir. [Madrigal-Bujaidar ve ark., 2001].

Grover ve ark. (2003) pestisit üretiminde çalışarak pestisite maruz kalan işçilerin lökositlerindeki DNA hasarlarını comet testi ile araştırmışlardır. 54 pestisit işçisi ve aynı sayıda kontrol grubu oluşturmuşlardır. İki grubunda yaş ortalamasının, sigara içme eğilimlerinin benzer olmasına dikkat edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kuyruk uzunluğu kontrol grubuna göre (8,938±2,889) işçilerde önemli bir artış (19,17±2,467; p<0,001) göstermiştir [Grover ve ark., 2003].

239 tarım işçisi ve 231 sağlıklı kişi ile periferik kan lenfositleri ve ağız mukoza hücrelerindeki sitogenetik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada MN frekansı değerlendirilmiştir. Ayrıca ilaç maruziyeti yüzünden lenfositlerin çoğalma kinetiklerinde mümkün değişimleri belirlemek için sitokinezi durdurulmuş bölünme indeksi (CBPI) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hem lenfosit hem de ağız epitel hücreleri için kontrollerle kıyaslandığında MN frekanslarında hiçbir artış olmadığını göstermiştir. Fakat CBPI'da önemli bir azalma belirlenmiştir. Farklı faktörlerin (cinsiyet, şehir, sigara, vb.) etkisi göz önüne alındığında ise MN frekansı önemli bir artış göstermiştir [Pastor ve ark., 2003].

Naravaneni ve Jamil (2007) pestisite maruz kalan 210 işçi ile pestisite maruz kalmayan 160 kişilik kontrol grubundan genotoksisite ve AChE (asetilkolin esteraz) düzeylerini belirlemişlerdir. Kolorimetrik metod ile RBC (Red Blood Cell=Kırmızı Kan Hücre) düzeyi ve AChE kontrole göre anlamlı düşüş göstermiştir. Ayrıca DNA hasarı ve KA frekansında da kontrole göre önemli düzeyde artış gözlenmiştir [Naravaneni ve Jamil, 2007].

Dinocap fungusunun *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde genotoksik etkileri KA testi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar tüm uygulama sürelerinde (12, 24 ve 48 saat) ve dozlarında (6,25; 12,5; 25 ve 50 ppm: 100 ppm toksik etki göstermiştir) KA frekansında artış belirlenmiştir. Fragment, kromozom kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme ve tetraploidi anormallikleri belirlenmiştir. Aynı çalışmada insan lenfositlerinde de genotoksisite araştırması yapılmıştır. KA ve KKD frekanslarındaki etkiler belirlenmiştir. KA testi sonucunda en düşük doz (5 ppm) tüm uygulama sürelerinde (24 ve 48 saat) önemli bir etki göstermezken, 10; 15 ve 20 ppm'lik dozlarda her iki uygulama süresinde de doza bağlı artış gözlenmiştir. KKD frekansı ise kontrole göre 24 saatlik uygulamada en yüksek dozda (20 ppm) ve 48 saatlik uygulamanın tüm dozlarında istatistiksel olarak önemli artışa sebep olmuştur [Çelik, 2003].

Dimitrov ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada üç farklı herbisit (Roundup, Stomp ve Reglone)'in *Crepis capillaris L.* kök meristemlerinde ve fare kemik iliğinde KA ve MN testlerini çalışmışlardır. Roundup KA ve MN frekanslarında herhangi bir artışa sebep olmamıştır. Reglone ise KKD frekansını etkilemezken MN frekansını bitki ve fare kemik iliği polikromatik eritrositlerde (PCEs) artırmıştır. Stomp bitki hücrelerinde KA frekansını etkilememiştir fakat fare hücrelerinde artışa sebep olmuştur. Ayrıca Stomp her iki test materyalinde de MN frekansını artırmıştır. Bitki hücrelerindeki MN artışının sebebi Stomp'un iğ ipliği oluşumunu engellenmesinden, fare kemik iliğindeki KA frekansının artışının sebebinin ise genotoksik metabolitlerin biyosentezinden dolayı olabileceği düşünülmüştür [Dimitrov ve ark., 2006].

Yüzbaşıoğlu ve ark. (2006) Afugan'ın genotoksisitesini belirlemek için insan lenfositlerinde KKD, KA ve MN testlerini uygulamışlardır. KKD frekansında tüm uygulama sürelerinde (24 ve 48 saat) ve tüm dozlarda (2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 µg/ml) kontrole göre doza bağlı istatistiksel artış belirlenmiştir. KA frekansı en düşük doz hariç (2,5 µg/ml) diğer dozlarda kontrole göre doza bağlı önemli bir artış göstermiştir. Ayrıca MN frekansında tüm dozlarda doza bağlı istatistiksel artış belirlenmiştir [Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006].

Conan 5FL (hexaconazole) fungusitinin fare kemik iliği hücreleri ve insan lenfositlerinde genotoksik etkilerini belirlemek için KA ve KKD testleri uygulanmıştır. Conan 5FL'nin üç farklı dozu (insan lenfositlerinde: 17,50; 35,00 ve 70,00 µg/ml ve fare kemik iliğinde: 17,50; 35,00 ve 70,00 mg/kg) çalışılmıştır. Her iki test sisteminde de Conan 5FL KA frekansını (fare kemik iliği için 17,50 mg/kg hariç) önemli düzeyde artırmıştır. Memeli hücrelerinde bu fungusitlerin yapısal ve sayısal anormalliklere sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu kromozom anormallikleri kromatid ve kromozom kırıkları, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozomlar, halka kromozom ve poliploidi'dir. KKD frekansı ise tüm uygulamalarda negatif kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir [Yılmaz ve ark., 2008].

Organofosfatlı bir insektisit olan Acephate'ın insan lenfositlerinde genotoksik etkileri KA, KKD ve MN testleri ile incelenmiştir. Ayrıca DNA hasarlarını belirlemek için comet testi kullanılmıştır. Acephate'ın 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 ve 200,0 µg/ml⁻¹lik dozlar uygulanmıştır. Tüm dozlarda KA ve MN frekansları doza bağlı artış göstermiştir. Ayrıca KKD frekansı 24 saatlik uygulamanın 50,0; 100,0 ve 200,0 µg/ml⁻¹lik dozlarında ve 48 saatlik uygulamanın tüm dozlarında (en düşük doz hariç) doza bağlı artış göstermiştir. Comet testi sonuçlarında kuyruk uzunluğu en yüksek iki dozda, doza bağlı artış göstermiştir. Kuyruk yoğunluğunda ise yalnız en yüksek dozda anlamlı bir artış belirlenmiştir [Özkan ve ark., 2009].

Kocaman ve Topaktaş (2008) piretroit sınıfında yer alan α -cypermethrin'in *in vitro* insan lenfositlerinde KKD, KA ve MN metodu ile genotoksisitesini araştırmışlardır.

24 ve 48 saatlik sürelerde Cypermethrin'in 5; 10; 15 ve 20 g/ml'lik dozları uygulanmıştır. KKD ve KA tüm uygulama sürelerinde ve tüm dozlarda artış göstermiştir. MN frekansı ise 5 ve 10 g/ml'lik dozlarda kontrole göre artış göstermiştir. Ayrıca Cypermethrin tüm uygulama sürelerinde 10; 15 ve 20 g/ml'lik dozlarda kontrole göre çoğalma indeksini azaltmıştır. Mİ ve NBI'yi tüm uygulama sürelerinde ve tüm dozlarda azalttığı da belirlenmiştir. Bu etki doza bağlı olarak ortaya çıkmıştır [Kocaman ve Topaktaş, 2008].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

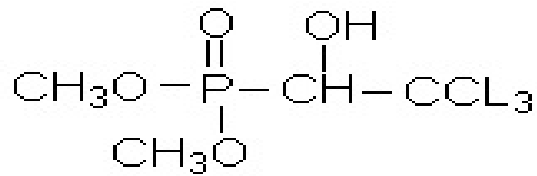
Bu araştırmada Trichlorfon ve Phorate organofosfatlı insektisitlerinin *in vitro* genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla insan periferel kan kùltürü ve izole lenfositler kullanılmıştır. Araştırmada bir bayan ve bir erkek olmak üzere iki donör kullanılmıştır. Donörlerin sigara, alkol ve ilaç kullanmamasına, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik herhangi bir ajana maruz kalma öyküleri bulunmamasına dikkat edilmiştir.

3.1.2. Test materyali

Araştırmada kullanılan test materyallerinden Trichlorfon (Katalog No:52-68-6) ve Phorate (Katalog No:298-02-2) Dr. Ehrenstorfer'den temin edilmiştir.

Trichlorfon

Trichlorfon kimyasal adı dimethyl (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl) phosphonate olan organofosfatlı bir bileşiktir. Molekül formülü $C_4H_8Cl_3O_4P$ 'dir. Molekül ağırlığı 257.4'dir. Renksiz veya soluk sarı renkte, kristalize, ergime noktası $93,3^{\circ}C$ 'dir. Suda serbestçe (120 mg/ml) çözünür. Bu insektisitın yapısal formülü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Trichlorfon insektisitinin yapısal formülü

3.2. Metot

3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar

Kromozom Anormalliği ve Kardeş Kromatid Değişimi Çalışmaları

Alınan periferik kan 1/10 oranında heparinize edilmiştir. Bu kandan besi ortamına (chromosome medium B) 0,2 ml ekilmiştir. Kan besi ortamına ekildikten sonra bu ortama daha önce sartorius membran filtre ile steril edilmiş BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüpler daha önceden 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra Trichlorfon'un (2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50 µg/ml'lik) ve Phorate'ın (0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 µg/ml'lik) dozları kültüre ilave edilmiştir. Pozitif kontrol tüpüne 0,20 µg/ml mitomisin C (MMC) eklenmiştir. Ekimler bittikten sonra tüpler inkübatöre alınmıştır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe 0,06 µg/ml olacak şekilde kolkisin solüsyonu eklenmiştir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra tüpler 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatant kısım atılmıştır. Lenfosit hücrelerini içeren 0,5-0,7 ml'lik kısmın vorteks yardımıyla karışması sağlanmıştır. Daha sonra bu tüplere hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl) vorteks üzerinde (5 ml) ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Hipotonik solüsyon eklenen tüpler 37°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Etüvden alınan tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan süpernatant atılarak, önceden buzdolabında soğutulan fiksatif (3:1, metanol:asetik asit) vorteks üzerinde (5ml) eklenmiştir. Buzdolabında tüpler +4°C'de 45 dakika beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Fiksatifle yıkama işlemi iki kez daha tekrar edilmiştir. Son fiksatif işleminden sonra tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 ml'lik beyaz kan hücrelerini içeren çökelti pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir. Pastör pipetine çekilen süspansiyon, önceden temizlenmiş ve %70'lik etil alkolde

buzdolabında bekletilen lamlara 15-20 cm yükseklikten damlatılarak hücrelerin patlatılması ve kromozomların yayılmaları sağlanmıştır. Hazırlanan preparatlar 24 saat oda sıcaklığında ışık almayan ortamda kurumaya bırakılmıştır.

Mikronükleus Çalışması

Mikronükleus çalışmasında, 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 ml periferik kan, steril şartlar altında 2,5 ml'lik chromosome medium B'ye ekilmiştir. Kültür tüpleri daha sonra 37°C'de 72 saat inkübasyona alınmıştır. Kültüre alınmış lenfositler insektisitlerle sadece 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Bu nedenle kültür süresinden 24 saat sonra Trichlorfon ve Phorate'ın dozları ile, pozitif kontrol MMC (0,20 µg/ml) tüplere ekilmiştir. Negatif kontrol grubuna aynı miktarda steril su ilave edilmiştir. İnkübasyonun 44. saatinde hücrelerin sitoplazma bölünmesini durdurmak için ortama sitokalsin B (cytochalasin B) ilave edilmiştir. Kültür süresi bitiminde tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atılmış ve tüpün dibindeki hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik kısmı vortex üzerinde karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu işlemden sonra hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl) vorteksde (5 ml) ilave edilmiştir. Daha sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı atılmıştır. Tüplere önceden buzdolabında soğutulan 3:1 metanol:asetik asitten oluşan fiksatiften vortex üzerinde (5 ml) ilave edilmiştir. Fiksatif eklenen tüpler 10 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Fiksatifte yıkama işlemi ikinci kez tekrarlandıktan sonra üçüncü fiksatife sitoplazmaların korunması amacıyla %1'lik formaldehit eklenmiş ve son santrifüje tabii tutulmuştur.

Son santrifüj işleminden sonra tüplerin süpernatantı atılıp tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 ml'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pipete çekilen süspansiyon daha önceden temizlenmiş ve %70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen lamlar üzerine 10-15 cm yükseklikten yayılmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumaları için 24 saat oda sıcaklığına bırakılmıştır.

Preparatların boyanması

Herbir uygulama için hazırlanan preperatların bir kısmı kromozom anormalliği, mikronükleus ve mitotik indeks oluşumlarının tespit edilmesi için homojen olarak boyanmaya ayrılmıştır. Bu amaçla preperatlar tamamen kuruduktan sonra Sorensen tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 15-20 dakika boyanmıştır. Kardeş kromatid değişimlerinin belirlenmesi için Speit ve Houpter'ın (1985) bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla geliştirdikleri metod bir takım değişikliklerle kullanılmıştır [Speit ve Houpter, 1985]. Bu yöneme göre tamamen kurutulan preperatlar düz bir tepsiye konarak üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu (Sorensen tamponu, pH=6,8) ile iyice kapatılmıştır. Bu şekilde ışınlama solüsyonu ile kapatılan preperatlar 15 cm yükseklikten 254 nm dalga boyunda ışık yayan UV lambası ile karanlıkta ışınlamaya maruz bırakılmıştır. Işınlama sonunda preperatlar 60°C sıcaklıktaki 1×SSC (sodyum klorür + tri-sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra Sorensen tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 20 dakika boyanmıştır.

Her iki yöntemde de Giemسادan çıkarılan preperatlar saf sudan geçirilip, boyanın fazlasının akması sağlanmıştır. Bütün bu işlemlerden sonra oda sıcaklığında kurutulan preperatlar DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopta incelemeye alınmışlardır.

Kromozom Anormalliklerinin Saptanması

Kromozomal anormalliklerin hesaplanmasında ise her bir doz için kromozomları iyi dağılmış, kadın ve erkek bireylere ait preperatlardan 100'er hücre olmak üzere 200 hücre sayılarak kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. İncelenen 200 hücre içinde anormal hücre yüzdesi ve bir hücreye düşen kromozom anormalliği sayısı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada anormal hücre frekansı ve hücre başına düşen kromozom anormalliğinin istatistiksel hesaplanmalarında doz etki ilişkisini belirlemek için

SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır. Deney gruplarındaki kromozom anormalliklerinin kontrol grubu ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için z-testi uygulanmıştır.

Mitotik İndeksin Saptanması

Tüm uygulamalar için hazırlanan preparatların herbirinden 1000'er hücre olmak üzere toplam 2000 hücre sayılarak mitotik indeks (MI) saptanmıştır. Metafaz evresinde bulunan hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı yüzde olarak hesaplanıp mitotik indeks tesbiti yapılmıştır.

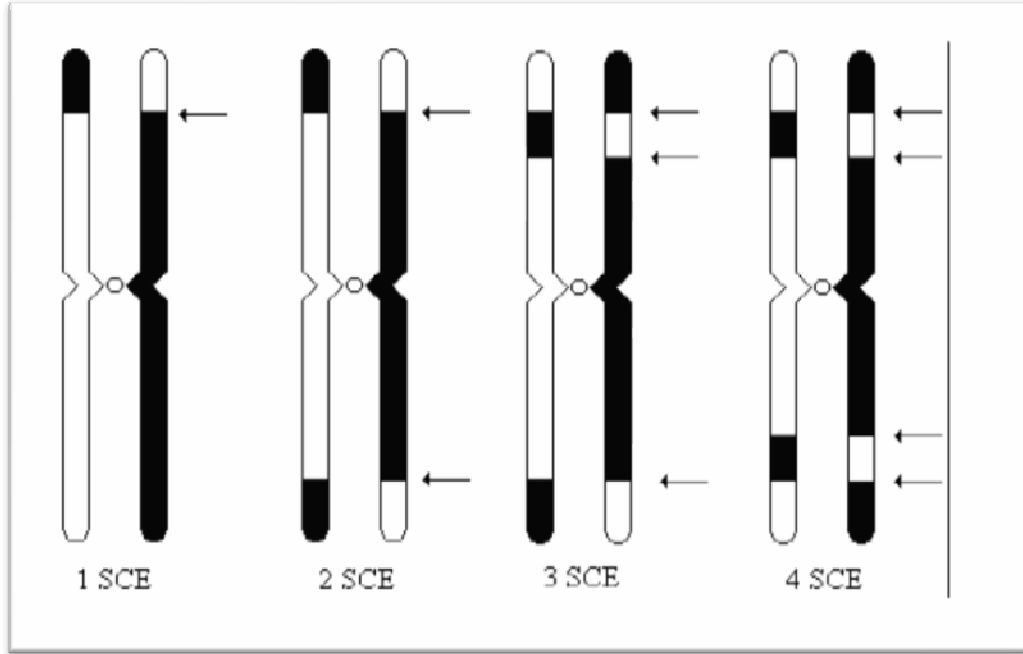
Mitotik indeksin istatistik hesaplamaları için doz etki ilişkisini belirlemede SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır. Ayrıca deney gruplarının kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesi için z dağılım testi uygulanmıştır.

Kardeş Kromatid Değişiminin Saptanması

Kardeş kromatid değişiminin hesaplanması için kadın ve erkek bireylere ait preparatlardan kromozomları iyi dağılmış hücreler seçilerek, ikinci mitozu geçiren 25'er hücre olmak üzere her bir uygulama dozu için toplam 50 hücrenin incelenmesi yapılmıştır.

Kardeş kromatid değişimi sayısı bir kromozomun koyu boyanmış kromatidindeki açık parçaların ya da açık boyanmış kromatidindeki koyu parçaların sayılmasıyla meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesidir (Şekil 3.3).

Her bir uygulama grubunda oluşan değişimlerin negatif kontrole göre anlamlılık değerleri t-testi ile tespit edilmiştir. Doz etki ilişkisini belirlemek için SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır.



Şekil 3.3. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri

Replikasyon İndeksinin Saptanması

Her uygulama için kadın ve erkek bireylere ait preparatların herbirinden 100'er hücre olmak üzere toplam 200 hücre incelenmiştir. İncelenen hücrelerdeki birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) metafaz evresindeki hücreler sayılmıştır. Sonuçta;

$$\text{Replikasyon İndeksi} = (1 \times M_1) + (2 \times M_2) + (3 \times M_3) / N$$

(N =İncelenen toplam hücre) formülü ile hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmanın sonunda replikasyon indeksi için doz etki ilişkisini belirlemek için SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır. Deney gruplarındaki replikasyon indeksinin kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde ise z-testi uygulanmıştır.

Nükleer Bölünme İndeksi Ve Mikronükleus Frekansının Saptanması

Herbir doz ve süre için erkek ve dişi bireylerin preperatlarından 1000'er olmak üzere 2000 hücrede mikronükleus frekansları saptanmıştır.

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) hesaplamalarında hiç bölünme geçirmemiş tek çekirdek bulunan hücreler N_1 , iki çekirdek bulunan hücreler N_2 , üç çekirdek bulunan hücreler N_3 , dört veya daha fazla çekirdek bulunan hücreler ise N_4 olarak belirlenmişlerdir. Nükleer bölünme indeksi saptanırken, her bir doz için erkek ve dişi bireylerden 500'er hücre olmak üzere toplam 1000 hücre sayılmıştır. Sonuçta;

Nükleer Bölünme İndeksi= $1 \times (N_1) + 2 \times (N_2) + 3 \times (N_3 + N_4) / N$
(N=İncelenen toplam hücre) formülü ile hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmada nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus frekansının istatistiksel analizinde doz etki ilişkisini belirlemek için SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır. Deney gruplarındaki nükleer bölünme indeksi ve mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z-testi uygulanmıştır.

3.2.2. İzole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar

Comet Testi

Bu teknik 1988 yılında Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar dikkate alınıp, bazı modifikasyonlara tabii tutularak kullanılmıştır. Comet testinde de yine her bir insektisit için sağlıklı, sigara ve alkol kullanmayan, bir erkek bir dişi donörden alınan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Donörlerden heparinli enjektörle alınan taze periferik kan ependorflara konulmuştur. Daha sonra 1'er ml PBS ependorflara ilave edilmiştir. Kan ve PBS süspansiyonu edilip, 100'er µl lenfosit ayırıcı (Biocoll) solüsyon ilave edilip +4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorfların içinde eritrositlerin üzerinde oluşan bulutsu kısmın 100'er µl'si

alınarak ayrı ependorfa aktarılmıştır. Daha sonra da stok haline gelmiş olan izole lenfositlerden 100'er µl'si her bir doz için ayrı ependorflar içine alınmıştır.

Alınan lenfositler, 100'er µl test maddesinin çeşitli dozları ile (Trichlorfon için 2,34; 4,69; 9,38; 18,75; 37,50 µg/ml'lik, Phorate için 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 µg/ml'lik, pozitif kontrolün (hidrojen peroksit= H_2O_2) 100 µM'lik dozları eklenip 37°C'de 1 saatlik inkübasyona tabi tutulmuştur. İzole edilen lenfositlerde, trypan blue ile hücrelerin canlılıklarının >%97 olduğu belirlenmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde ependorflar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp her bir doz 100'er µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Düşük erime ısıly agarın 75 µl'si alınarak 100 µl lenfositle karıştırılmış ve önceden yüksek erime ısıly agar ile kaplanan lamların üzerine damlatılıp yayılmıştır. Sonra üzeri lamel ile kapatılmıştır. Kapatılan preparatlar 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar üzerinde bulunan lameller dikkatli bir şekilde kaldırılmış ve içinde lysing solüsyonu bulunan (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris pH=10 içeren solüsyonun 89 ml'sine 1% Triton X-100 ve 10 % DMSO ilave edilmiştir) şaleler içerisine konulmuştur. Bu şekilde buzdolabında +4 °C'de en az 1 saat bekletilmiştir. Liziz işleminden sonra lamlar içerisinde elektroforez tamponu (pH>13, 300 mM NaOH, 1mM EDTA) bulunan tanka yerleştirilip 20 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bu işlemin amacı DNA sarmalının çözülmesini sağlamaktır. 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez işlemi uygulanmıştır. Bu sayede hasarlı DNA'ların göçmesi sağlanmıştır. Elektroforezden sonra lamlar, nötralizasyon tamponu (pH=7,5; 0,4 M Tris) ile 5'er dakika toplam üç kez muamele edilmiştir. Bu işlemden sonra herbir lamın üzerine 20 µg/ml'lik etidyum bromid yayılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Boyamaya alınan preparatlar +4 °C'de 10-15 dakika bekletilmiştir. Tüm bu işlemler, DNA hasarlarını önlemek için karanlık ortamda yapılmıştır.

Görüntü Analizi Ve Comet Sayımı

Boyanan preparatlar Olympus marka flöresan mikroskopta (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) 40× büyütmede incelenmiştir. Kullanılan her insektisit her bir dozu için bir donörden 100'er hücre olmak üzere toplam 200 hücre "Comet Assay IV

Perseptive Instruments Ltd., UK” kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu cinsiden değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz etki ilişkisini belirlemek için SPSS 13.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi yapılmıştır. Deney grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Trichlorfon'un KA Üzerine Etkileri

Trichlorfon'un uygulanması ile insan lenfosit kültürlerinde beş tip yapısal kromozom anormalliği tespit edilmiştir. Bu anormallikler kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozomlar'dır. Yapılan çalışma sonunda en fazla gözlenen anormallikler kromatid kırığı ve kromozom kırığı olarak tespit edilmiştir. Anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik oranının 24 saatlik uygulamanın en düşük dozu hariç diğer tüm doz ve sürelerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,99$ ve 48 saatlik uygulamada $r=0,99$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Resim 4.1). Ayrıca Trichlorfon'un 48 saatlik uygulamanın en yüksek dozunda toksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anomalliklerin tipleri ve frekansları

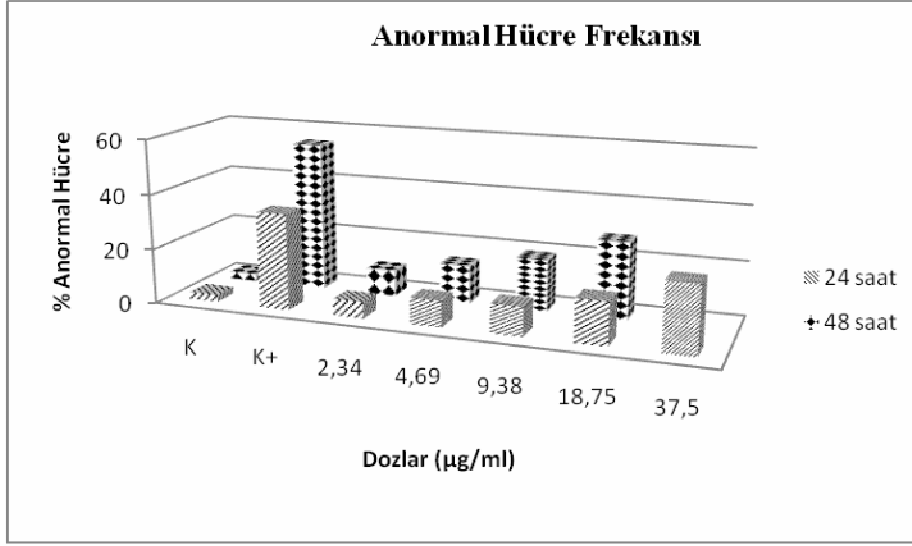
Test maddesi	Uygulama				Anomallikler					Anormal hücre- SH (%)		KA Hücre = SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)	ktk	kzk	f	kkb	dis	kd				
Kontrol	24	0,00	4	-	-	-	1	-	2,50±1,104	0,025±0,011		
MMC	24	0,20	38	18	-	6	7	9	35,00±3,373	0,390±0,034		
Trichlorfon	24	2,34	11	-	1	-	-	-	6,00±1,679	0,060±0,017		
	24	4,69	12	7	-	-	-	-	9,50±2,073**	0,095±0,021**		
	24	9,38	15	3	2	2	-	-	10,50±2,168**	0,110±0,022****		
	24	18,75	19	6	2	3	3	-	15,50±2,559****	0,165±0,026****		
	24	37,50	29	11	4	5	2	-	24,50±3,041****	0,255±0,031****		
Kontrol	48	0,00	4	-	-	-	1	-	2,50±1,104	0,025±0,011		
MMC	48	0,20	64	32	4	17	16	10	54,50±3,521	0,715±0,032		
Trichlorfon	48	2,34	12	6	-	1	-	-	9,50±2,073**	0,095±0,021**		
	48	4,69	18	7	1	2	1	-	14,00±2,454****	0,145±0,025****		
	48	9,38	19	10	1	5	4	-	19,00±2,774****	0,195±0,028****		
	48	18,75	34	9	6	7	4	-	28,00±3,175****	0,300±0,032****		
	48	37,50	-	-	-	-	-	-	TOKSIK	TOKSIK		

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik kromozom, f: fragmant, kd: kromatid değişimi

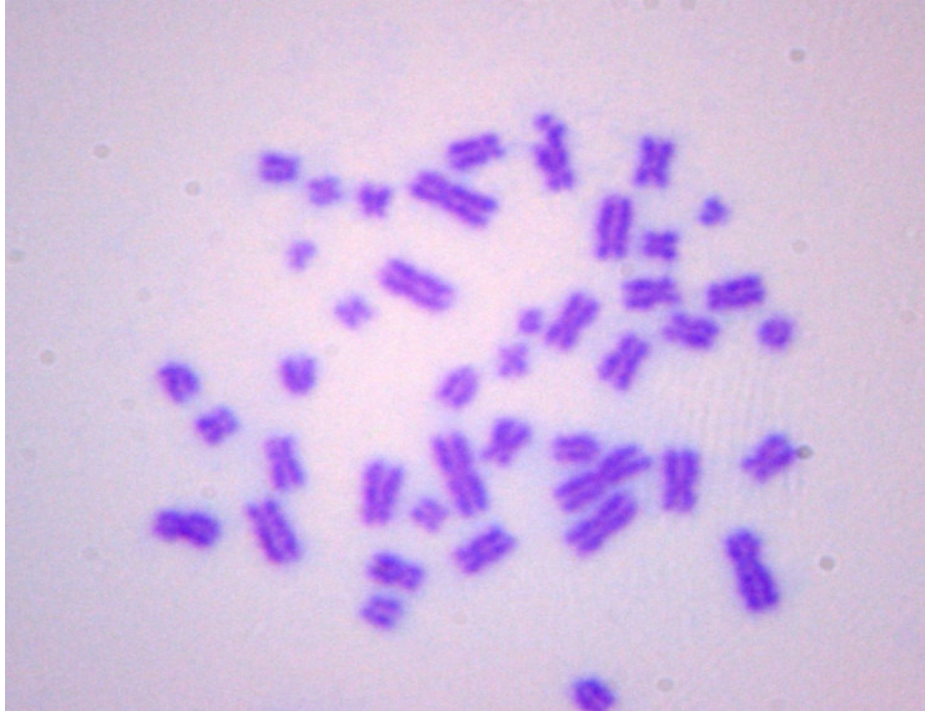
* Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrolle göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

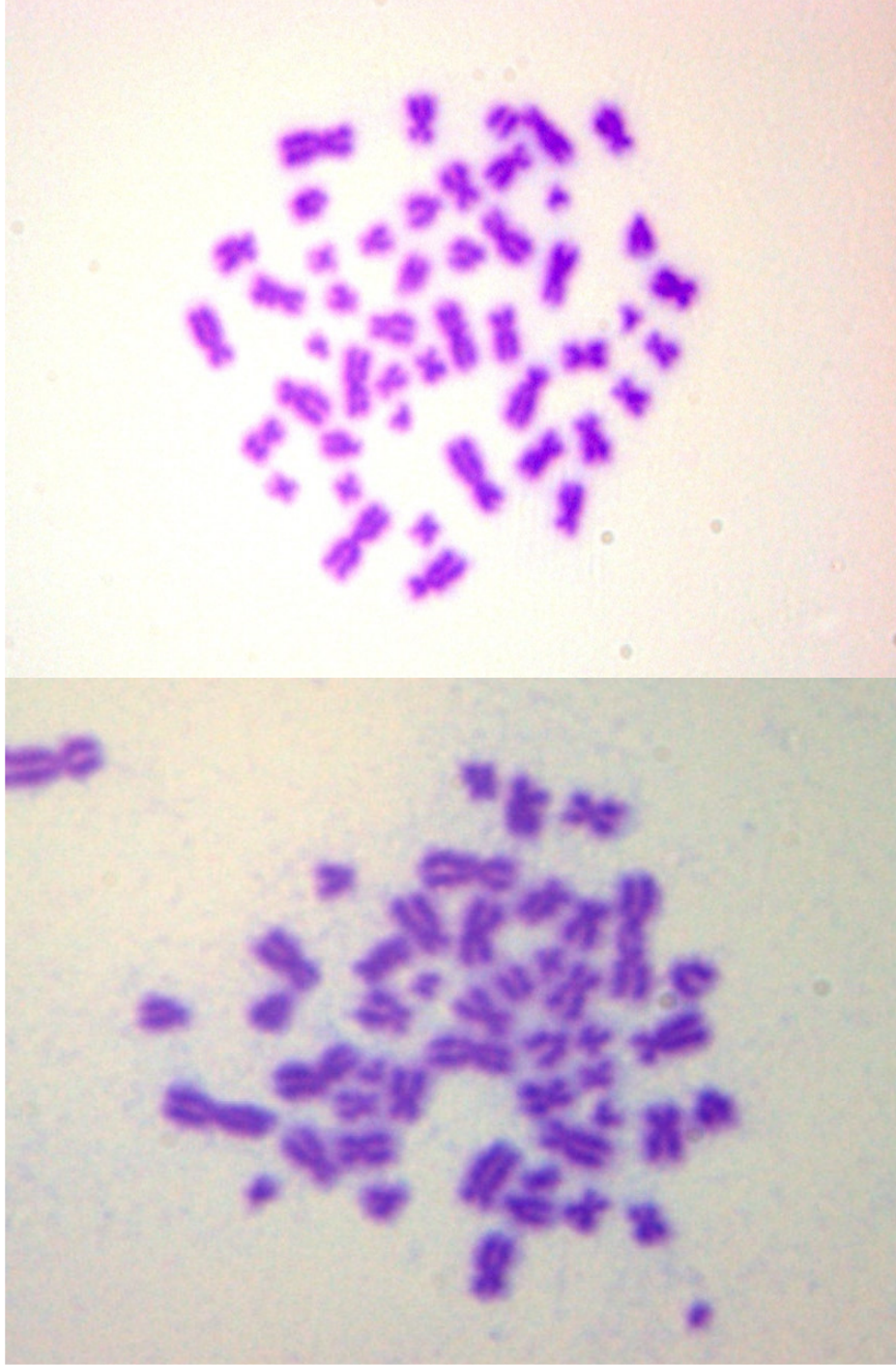
*** Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



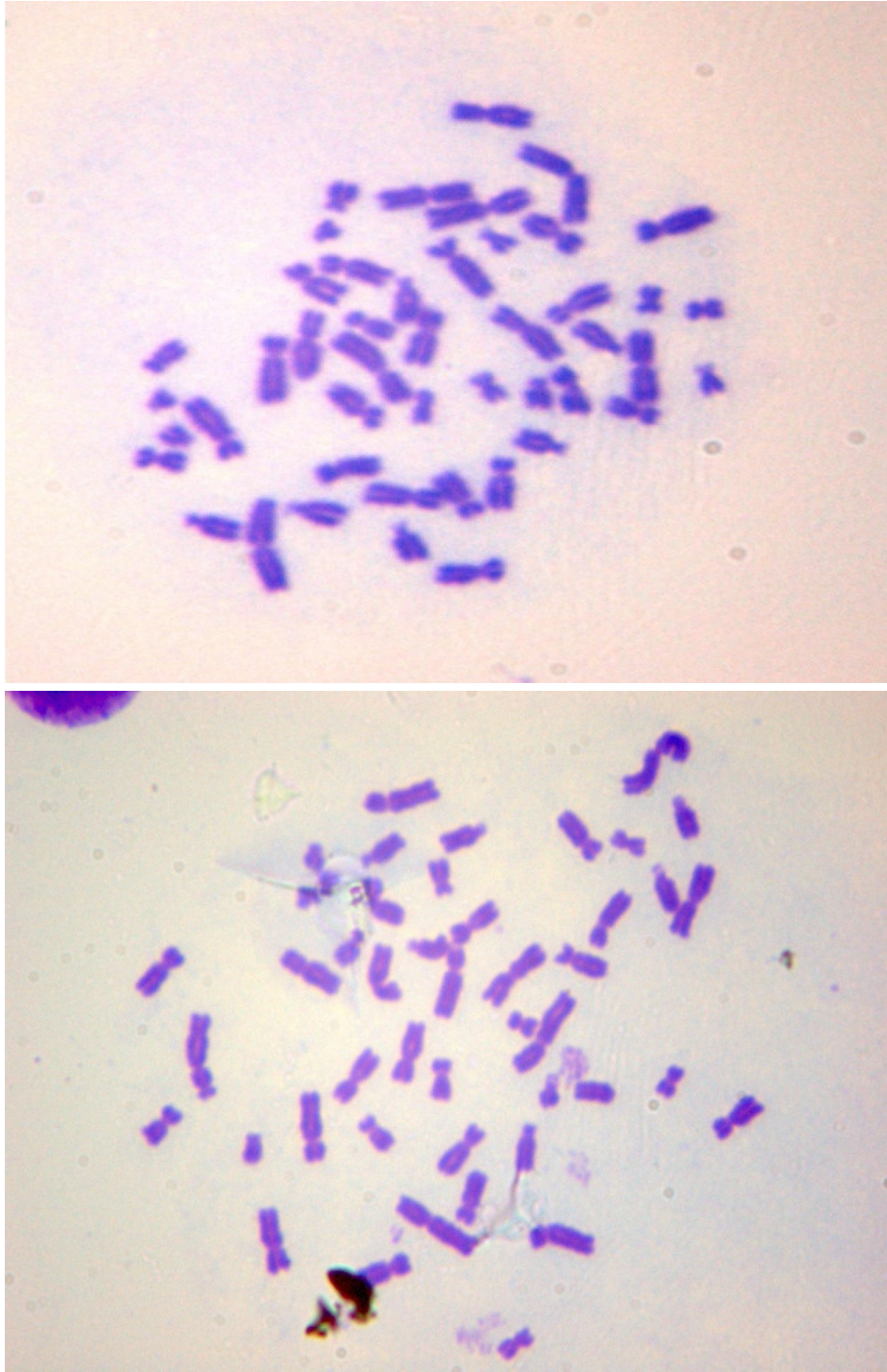
Şekil 4.1. Trichlorfon'un anormal hücre frekansı üzerine etkisi



Resim 4.1. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı



Resim 4.1. (Devam). Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anomallikler b) kromozom kırığı c) fragment



Resim 4.1. (Devam). Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler d) kardeş kromatidlerde birleşme e) disentrik kromozom

4.2. Trichlorfon'un KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri

Kardeş kromatid değişimi frekansı bütün dozlarda istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiş ve bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,92$ ve 48 saatlik uygulamada $r=0,74$) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2 ve Resim 4.2). Trichlorfon'un replikasyon indeksini doza bağlı olarak düşürdüğü fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=-0,96$ ve 48 saatlik uygulamada $r=-0,86$) (Çizelge 4.2). Mitotik indekste ise 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalarda kontrole göre tüm dozlarda düşüş belirlenmiştir. Bu düşüşün 24 saatlik uygulamanın 9,38 ve 18,75 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarında ve 48 saatlik uygulamanın 18,75 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 48 saatlik uygulamada bu düşüşün doza bağlı olduğu da belirlenmiştir (48 saatlik uygulamada $r=-0,98$). Trichlorfon'un 48 saatlik uygulamasında 37,50 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozu toksik etki göstermiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3).

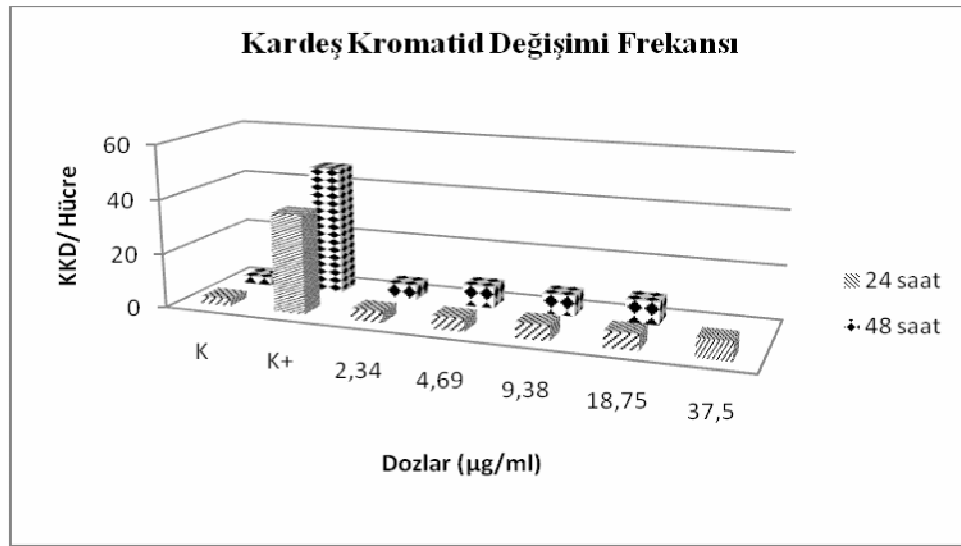
Çizelge 4.2. Trichlorfon'un insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkileri

Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süresi (saat)	Dozlar (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	1-5	2,64±0,15	21	43	136	2,575±0,048	7,40±0,585
MMC	24	0,20	19-50	36,42±1,19	66	72	62	1,980±0,057	3,70±0,422
Trichlorfon	24	2,34	2-8	4,04±0,22a	24	49	127	2,515±0,050	6,95±0,569
	24	4,69	3-7	4,66±0,18a	37	52	111	2,370±0,055	6,40±0,547
	24	9,38	4-9	5,66±0,21a	35	51	114	2,395±0,054	5,80±0,523*
	24	18,75	3-10	5,86±0,27a	43	50	107	2,320±0,057	5,20±0,496**
	24	37,50	3-14	6,82±0,34 a	49	93	58	2,045±0,052	6,30±0,543
Kontrol	48	0,00	1-5	2,64±0,15	21	43	136	2,575±0,048	7,40±0,585
MMC	48	0,20	27-69	47,44±1,62	45	77	78	2,165±0,054	3,35±0,402
Trichlorfon	48	2,34	2-12	5,44±0,34a	23	45	132	2,545±0,049	7,25±0,580
	48	4,69	4-17	7,74±0,45a	38	64	98	2,300±0,054	6,90±0,567
	48	9,38	4-15	7,40±0,39a	41	62	97	2,280±0,055	6,00±0,531
	48	18,75	5-16	8,28±0,31a	47	75	78	2,155±0,055	5,15±0,494**
	48	37,5	-	TOKSİK	-	-	-	TOKSİK	TOKSİK

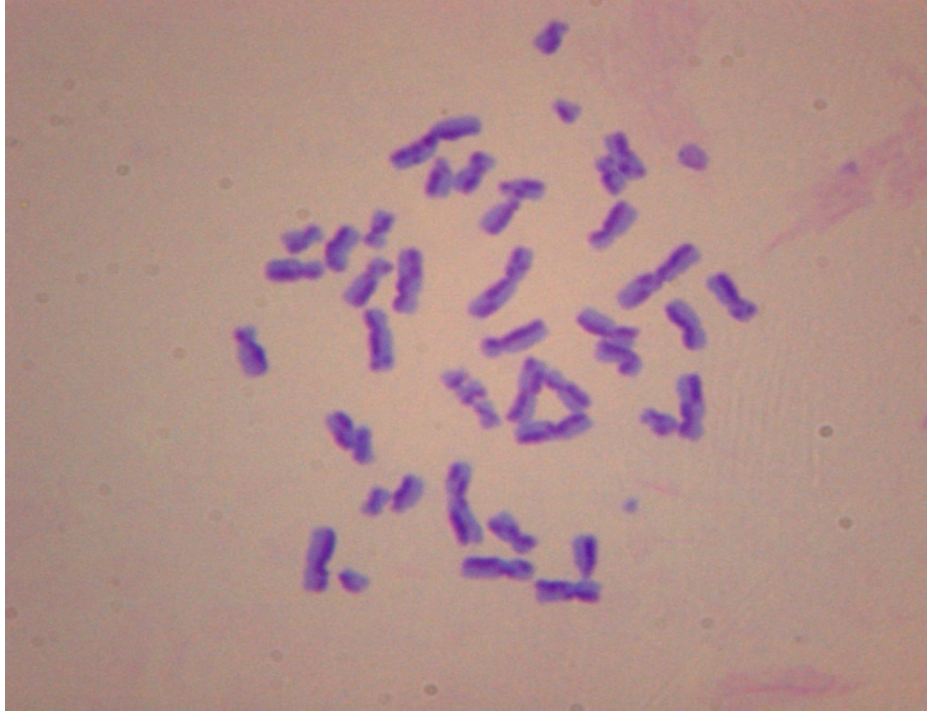
a Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

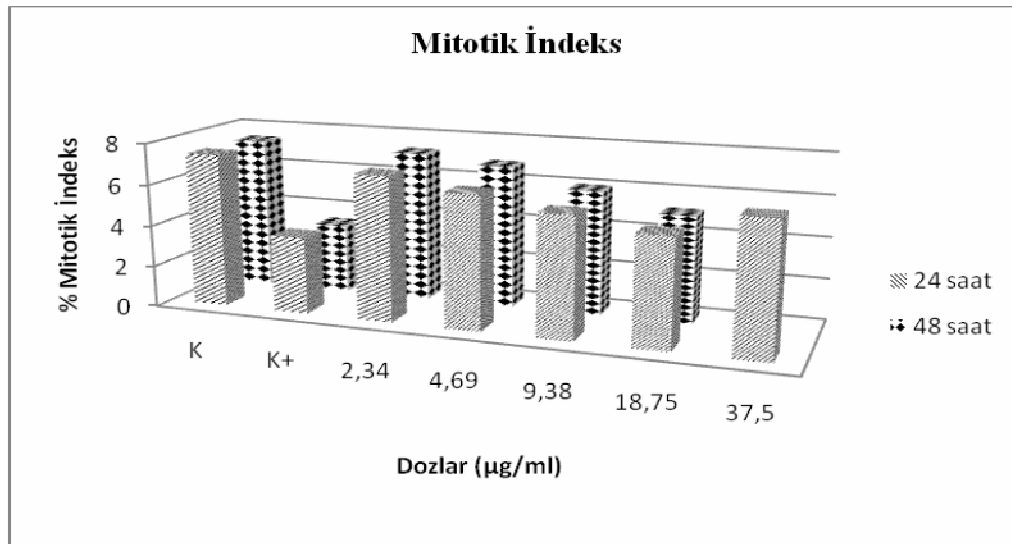
**Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.2. Trichlorfon'un kardeş kromatid değişimi frekansı üzerine etkisi



Resim 4.2. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri



Şekil 4.3. Trichlorfon'un mitotik indeks üzerine etkisi

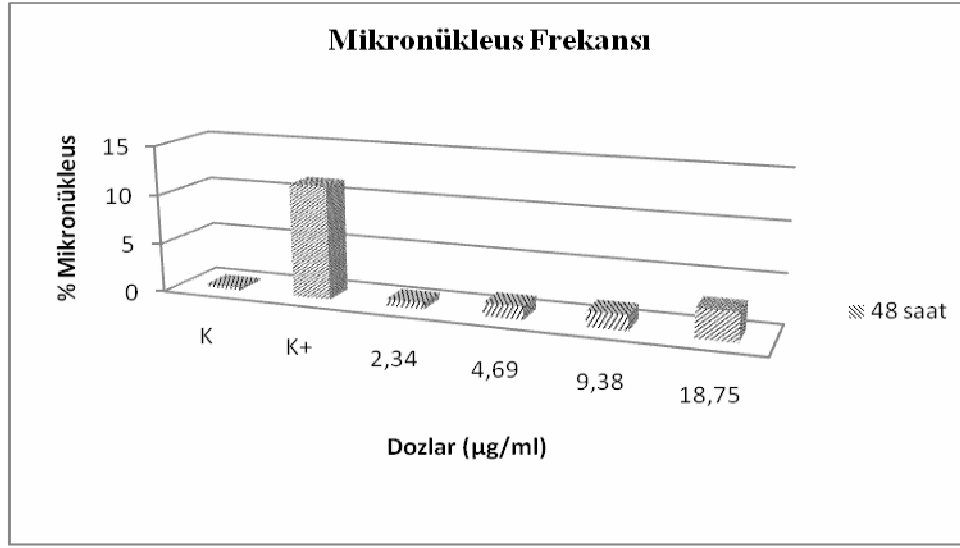
4.3. Trichlorfon'un MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri

Trichlorfon uygulamasıyla mikronükleus frekansları kontrole göre en düşük doz hariç istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı bir artış göstermiştir ($r=0,99$). Trichlorfon uygulaması ile binükleat hücrelerde bir, iki ve üç mikronükleuslu hücreler tespit edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.4 ve Resim 4.3). Ayrıca yapılan çalışmalarda Trichlorfon uygulamasının nükleer bölünme indeksinde istatistiksel olarak bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). En yüksek doz ise toksik etki göstermiştir.

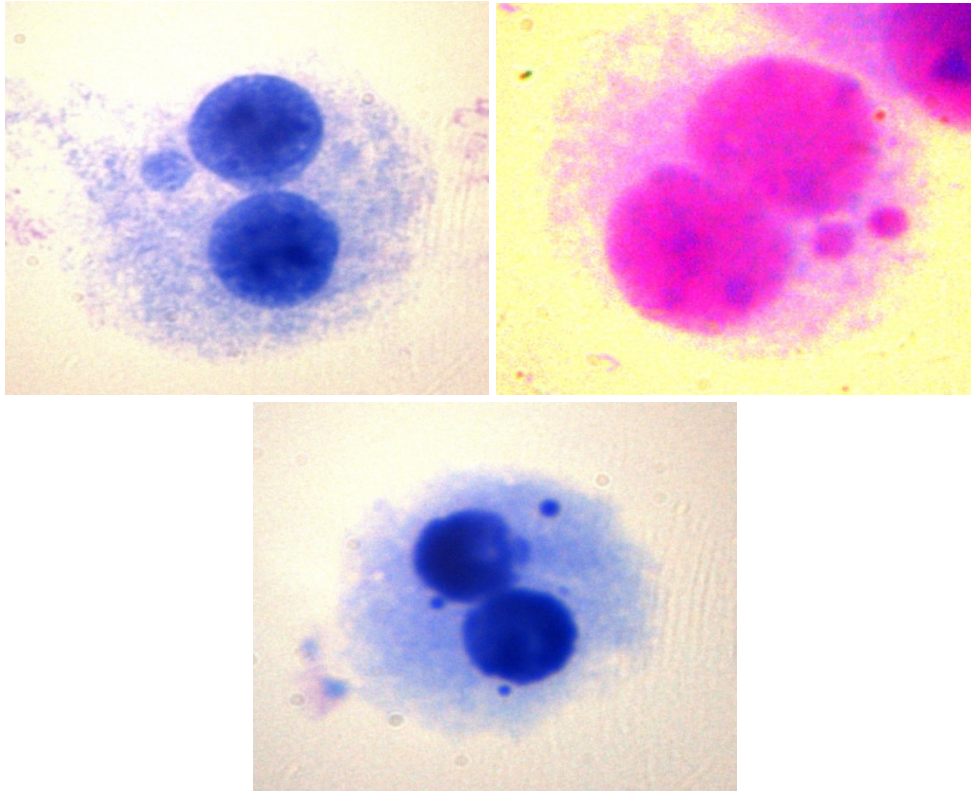
Çizelge 4.3. Trichlorfon'un insan lenfosit kültüründe MN frekansları ve NBİ üzerine etkileri

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	Binükleat hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN \pm SH (%)	Nükleer bölünme indeksi \pm SH (NBİ)
	Süre (saat)	Dozlar (μ g/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
	Kontrol	48	0,00	2000	5	-	-	-	0,25 \pm 0,112
MMC	48	0,20	2000	126	37	8	2	11,50 \pm 0,713	1,307 \pm 0,359
Trichlorfon	48	2,34	2000	13	-	-	-	0,65 \pm 0,180	1,698 \pm 0,409
	48	4,69	2000	20	3	-	-	1,30 \pm 0,253***	1,672 \pm 0,405
	48	9,38	2000	27	2	-	-	1,55 \pm 0,276***	1,513 \pm 0,386
	48	18,75	2000	34	9	2	-	2,90 \pm 0,375***	1,293 \pm 0,357
	48	37,50	2000	-	-	-	-	TOKSİK	TOKSİK

***Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.4. Trichlorfon'un mikronükleus frekansı üzerine etkisi



Resim 4.3. Trichlorfon uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus c) üç mikronükleus

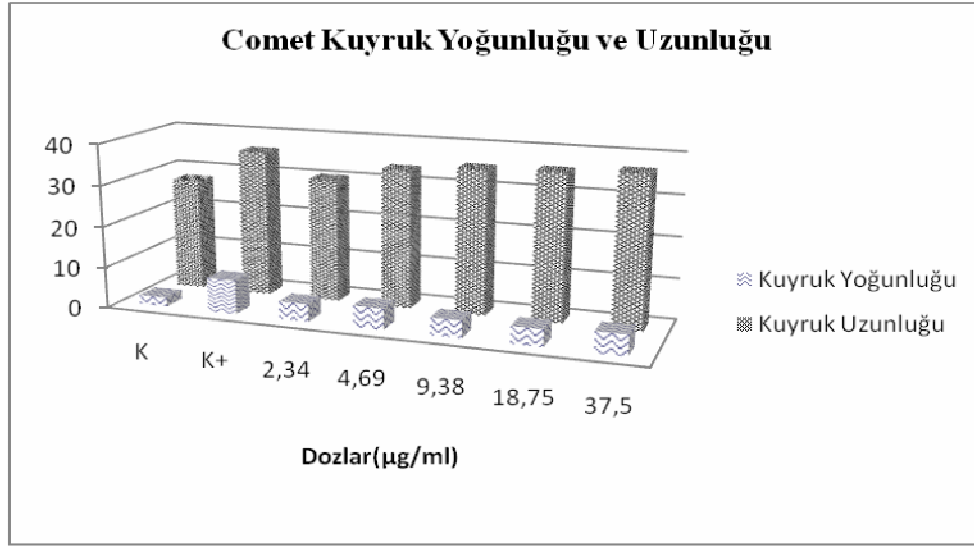
4.4. Trichlorfon'un Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkileri

Comet testi ile Trichlorfon'un insan lenfositlerinde DNA hasarına sebep olup olmadığı araştırılmıştır. Comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu tüm dozlarda önemli oranda artmıştır. Ayrıca en yüksek dozda Trichlorfon'un kuyruk uzunluğunda sebep olduğu DNA hasarının pozitif kontrole göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Trichlorfon'da kuyruk uzunluğundaki artış doza bağlı ($r=0,77$) iken kuyruk yoğunluğunda meydana gelen artışın doza bağlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.5 ve Resim 4.4).

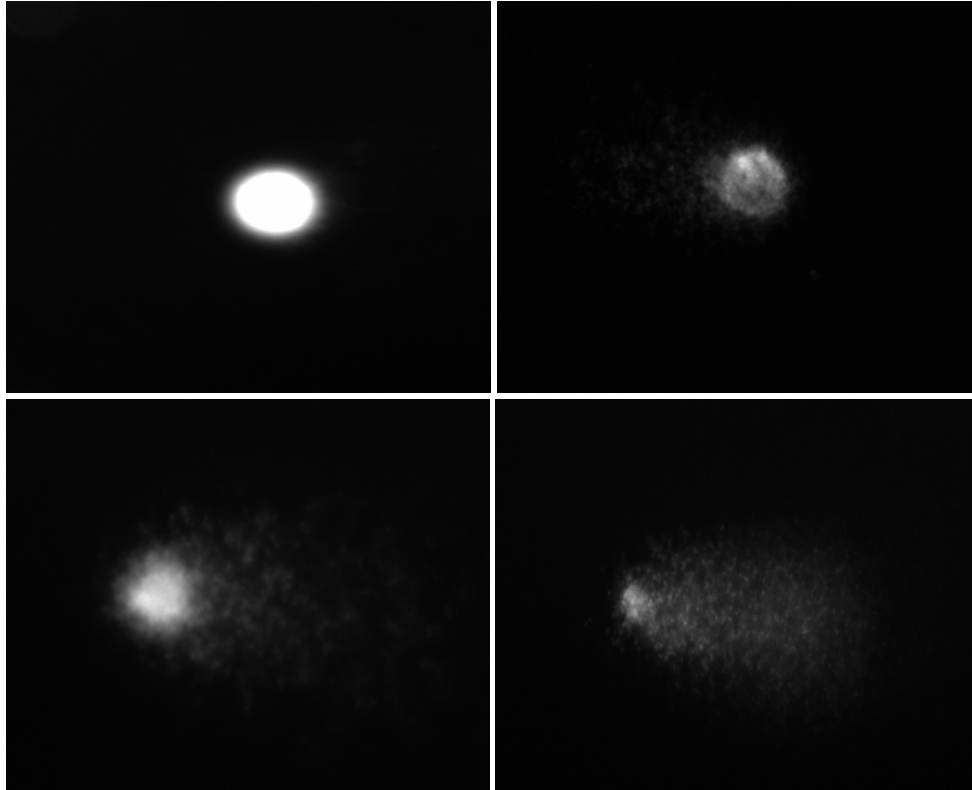
Çizelge 4.4. Trichlorfon ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	2,25 \pm 0,36	27,59 \pm 0,63
H ₂ O ₂	0,30	8,27 \pm 1,54	35,94 \pm 1,03
Trichlorfon	2,34	4,30 \pm 0,81*	30,22 \pm 0,43*
	4,69	5,15 \pm 0,91*	33,78 \pm 0,56*
	9,38	4,25 \pm 0,83*	35,23 \pm 0,48*
	18,75	4,20 \pm 0,66*	35,78 \pm 0,65*
	37,50	5,03 \pm 0,86*	36,75 \pm 0,63*

*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.5. Trichlorfon'un kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Resim 4.4. Trichlorfon ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

4.5. Phorate'ın KA Üzerine Etkileri

Phorate uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde toplam yedi tip kromozom anormalliğine rastlanmıştır. Bunların altı tipi yapısal kromozom anormalliği bir tipi ise sayısal kromozom anormalliğidir. Kromozomlarda yapısal olan değişiklikler kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatidlerde birleşme, disentrik kromozomlar ve kromatid değişimidir. Kromozomlardaki sayısal değişiklik ise poliploidi'dir. Bu anormalliklerden en sık rastlanan kromatid kırığı ve kromozom kırığı olarak tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormallik oranının istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı artış gösterdiği belirlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,93$ ve 48 saatlik uygulamada $r=0,91$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.6 ve Resim 4.5).

Çizelge 4.5. Phorate uygulaması ile insan lenfosit kültüründe oluşan kromozomal anomalliklerin tipleri ve frekansları

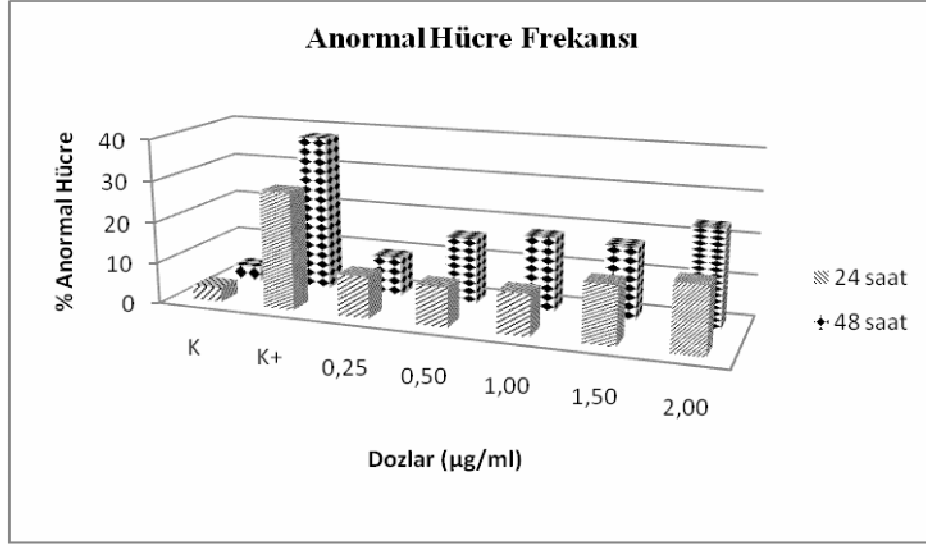
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre		KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)	ktk	kzk	f	kbb	dis	kd	p	± SH (%)		
Kontrol	24	0,00	4	2	-	1	-	-	-	-	3,50±1,300	0,035±0,013
MMC	24	0,20	23	14	1	8	9	6	-	-	28,50±3,191	0,305±0,033
Phorate	24	0,25	7	5	-	3	5	-	1	10,00±2,121**	10,00±2,121**	0,105±0,022**
	24	0,50	9	2	-	3	5	-	-	9,50±2,073*	9,50±2,073*	0,095±0,021*
	24	1,00	7	7	1	1	3	-	2	10,00±2,121**	10,00±2,121**	0,105±0,022**
	24	1,50	9	6	1	5	6	-	2	14,00±2,453****	14,00±2,453****	0,145±0,025****
	24	2,00	9	16	-	4	4	-	2	16,00±2,592****	16,00±2,592****	0,175±0,027****
Kontrol	48	0,00	4	2	-	1	-	-	-	-	3,50±1,300	0,035±0,013
MMC	48	0,20	30	19	3	9	9	13	2	38,00±3,432	38,00±3,432	0,425±0,350
Phorate	48	0,25	11	6	1	-	2	-	-	9,50±2,073*	9,50±2,073*	0,100±0,021**
	48	0,50	6	9	3	5	10	-	1	16,00±2,592****	16,00±2,592****	0,170±0,027****
	48	1,00	11	9	3	5	6	-	2	18,00±2,717****	18,00±2,717****	0,180±0,027****
	48	1,50	8	7	-	7	12	-	3	17,50±2,687****	17,50±2,687****	0,185±0,027****
	48	2,00	20	14	2	5	8	1	4	23,50±2,998****	23,50±2,998****	0,270±0,310****

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kbb-kardeş kromatidlerde bürleşme, dis: disentrik kromozom, kd:kromatid değışimi, p: poliploidi.

* Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrolle göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

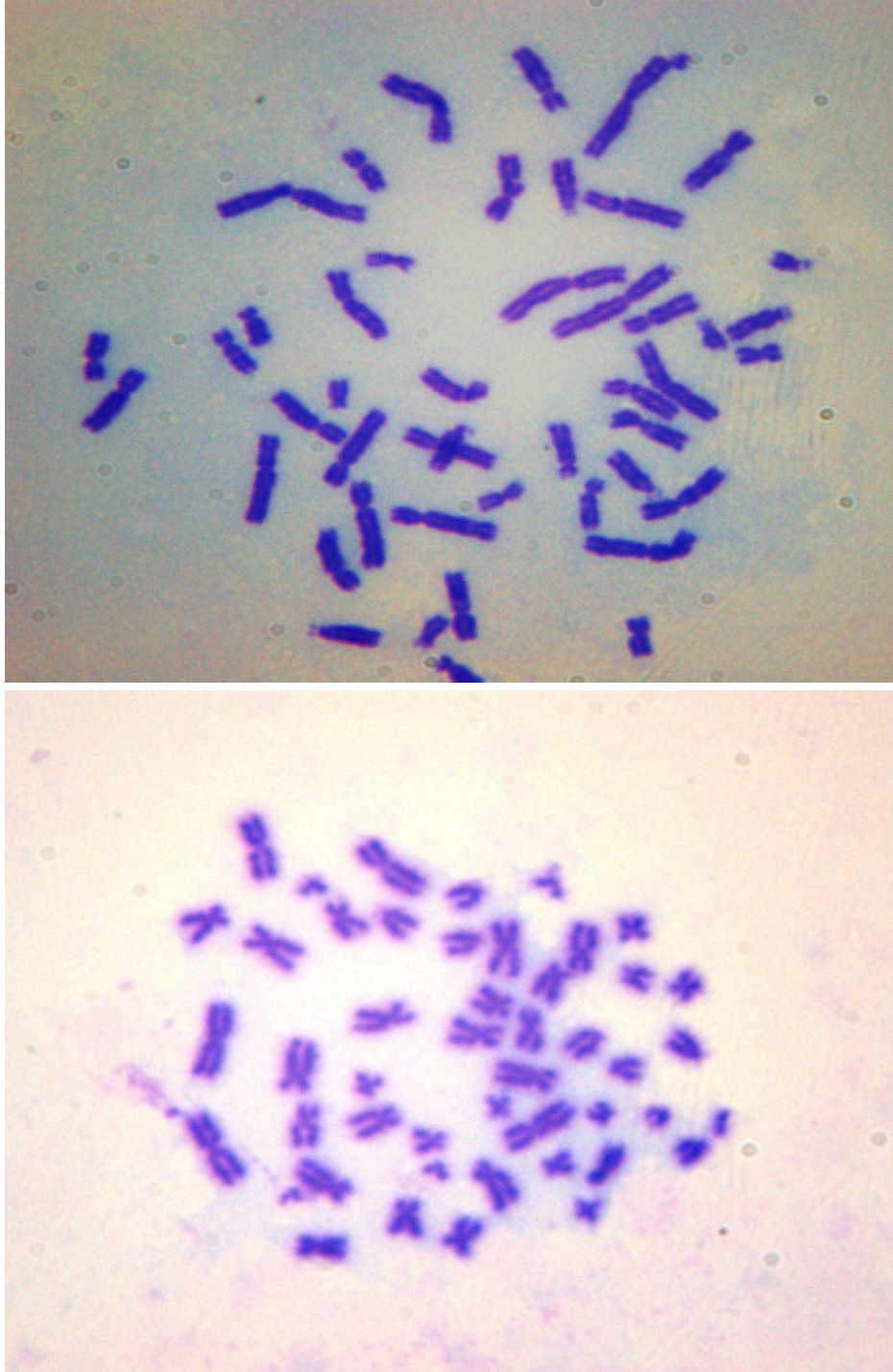
*** Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



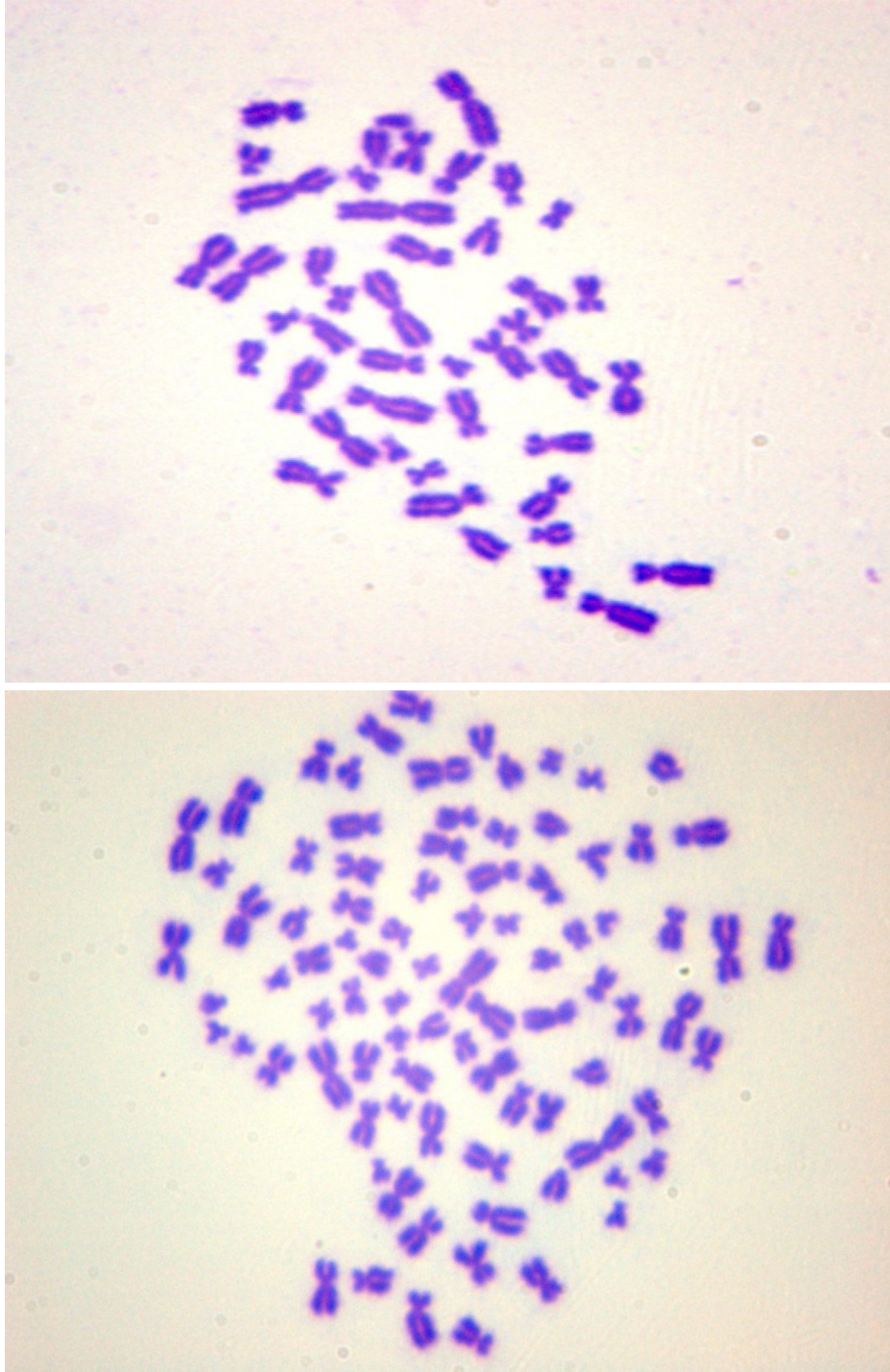
Şekil 4.6. Phorate'ın anormal hücre frekansı üzerine etkisi



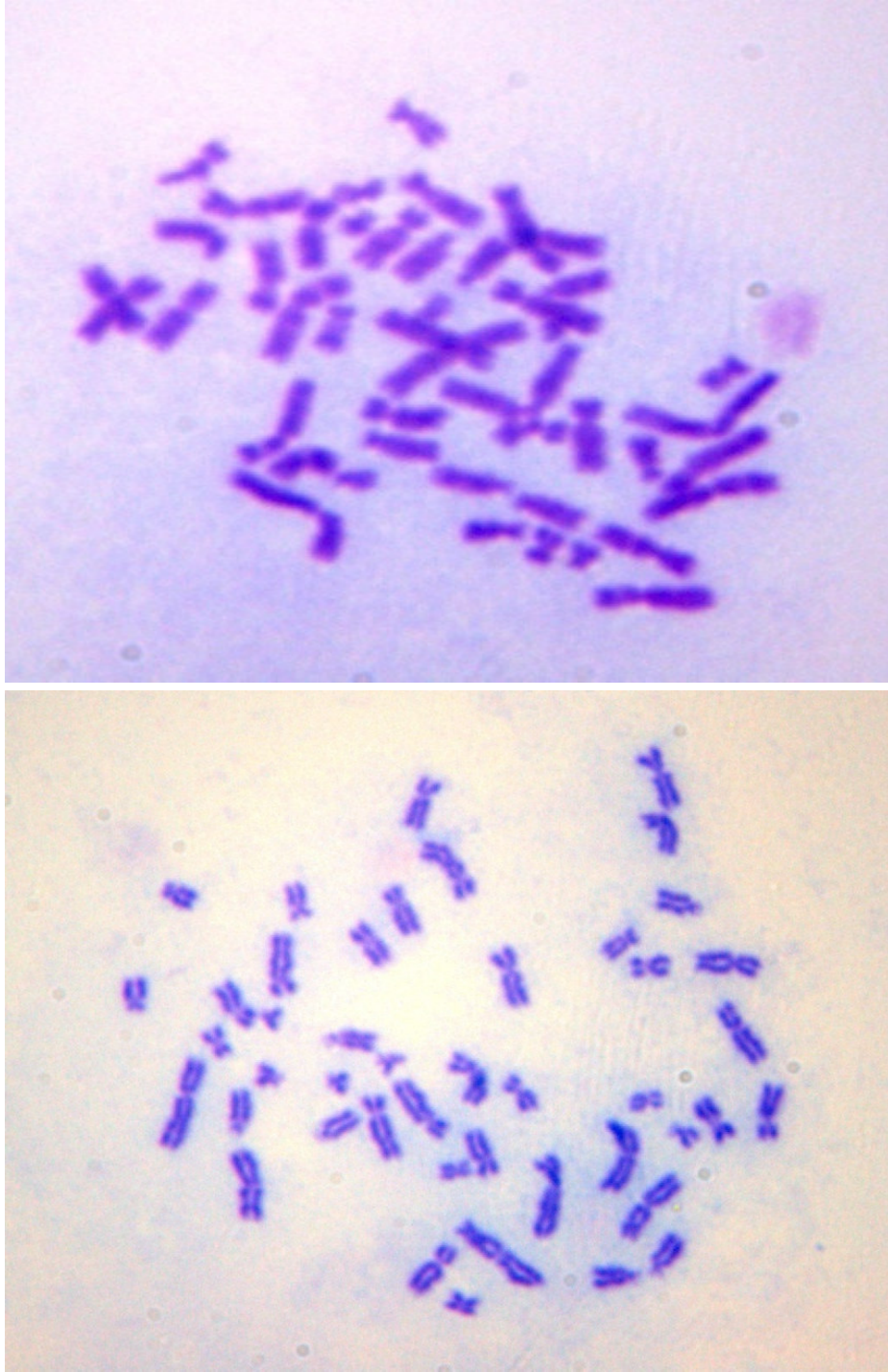
Resim 4.5. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anomallikler a) kromatid kırığı



Resim 4.5. (Devam). Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anomallikler b) kromozom kırığı c) fragment



Resim 4.5. (Devam). Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anomallikler d) kardeş kromatidlerde birleşme e) poliploidi



Resim 4.5. (Devam). Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler f) kromatid değişimi g) disentrik kromozom

4.6. Phorate'ın KKD, Rİ ve Mİ Üzerine Etkileri

Phorate uygulaması sonucunda, kardeş kromatid değişimi tüm dozlarda ve uygulama sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir fakat bu etkinin doza bağlı olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.7 ve Resim 4.6). Bu uygulamada, mitotik indekste 24 saatlik uygulama süresinde 1,00; 1,50 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarda ve 48 saatlik uygulamalarda ise 0,50; 1,00; 1,50 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı bir düşüş belirlenmiştir (24 saatlik uygulamada $r=-0,99$ ve 48 saatlik uygulamada $r=-0,82$) (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8). Yapılan çalışmalarda Phorate'ın replikasyon indeksini anlamlı oranda etkilemediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

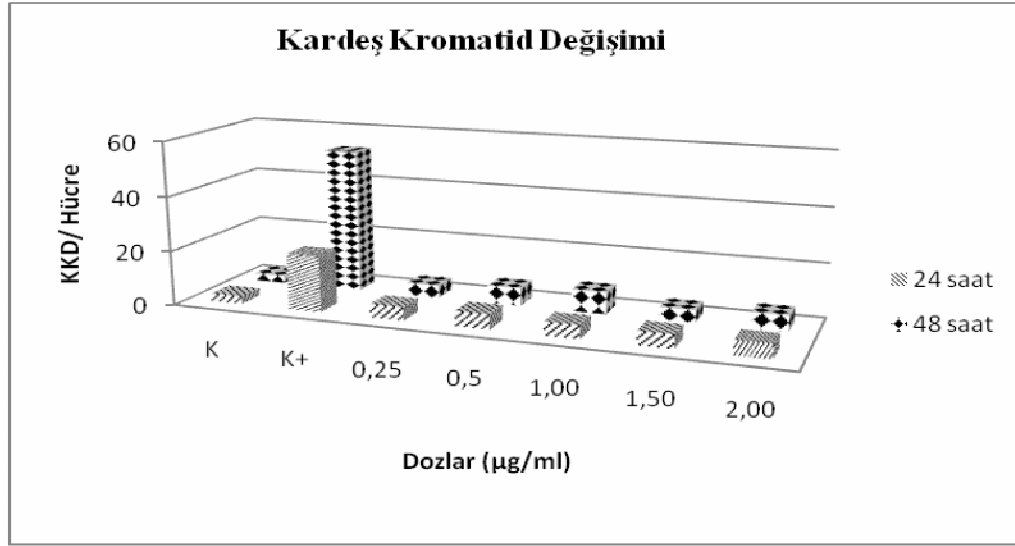
Çizelge 4.6. Phorate'ın insan lenfosit kültüründe KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkileri

Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH
	Süresi (saat)	Dozlar (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	1-6	2,72±0,20	17	39	144	2,635±0,045	6,55±0,553
MMC	24	0,20	10-36	20,56±0,79	67	61	72	2,025±0,059	2,95±0,378
Phorate	24	0,25	2-9	4,84±0,22a	20	38	142	2,610±0,047	5,75±0,521
	24	0,50	3-11	5,48±0,26a	20	39	141	2,605±0,047	5,25±0,499
	24	1,00	3-9	4,88±0,23a	19	39	142	2,615±0,046	4,15±0,446***
	24	1,50	3-8	4,96±0,20a	20	30	150	2,650±0,046	3,75±0,425***
	24	2,00	3-9	5,28±0,19a	21	38	141	2,600±0,048	3,05±0,385***
Kontrol	48	0,00	1-6	2,72±0,20	17	39	144	2,635±0,045	6,55±0,553
MMC	48	0,20	27-78	52,75±1,86	96	58	46	1,750±0,057	2,70±0,362
Phorate	48	0,25	2-9	4,64±0,22a	21	41	138	2,585±0,048	5,20±0,496
	48	0,50	3-11	6,52±0,30a	31	44	125	2,470±0,040	4,60±0,468**
	48	1,00	5-15	8,06±0,34a	15	37	148	2,665±0,043	4,25±0,451**
	48	1,50	2-8	4,64±0,21a	30	35	135	2,525±0,053	4,60±0,468**
	48	2,00	3-11	5,88±0,26a	22	43	135	2,565±0,048	3,85±0,430***

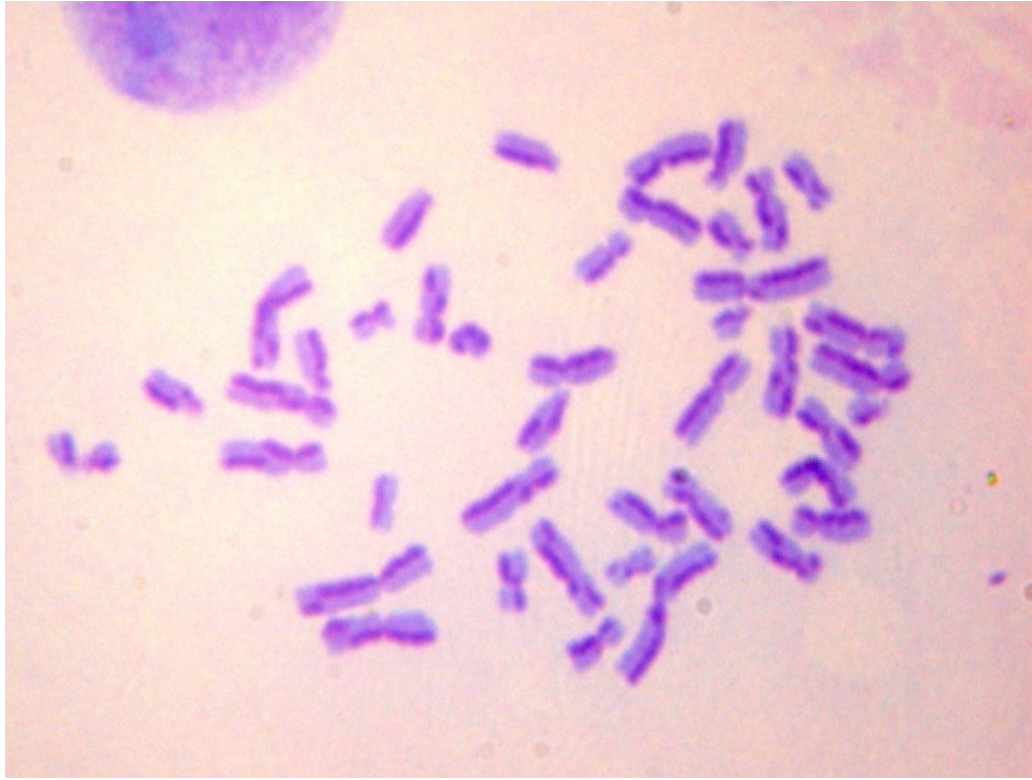
a Kontrolle göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

** Kontrolle göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

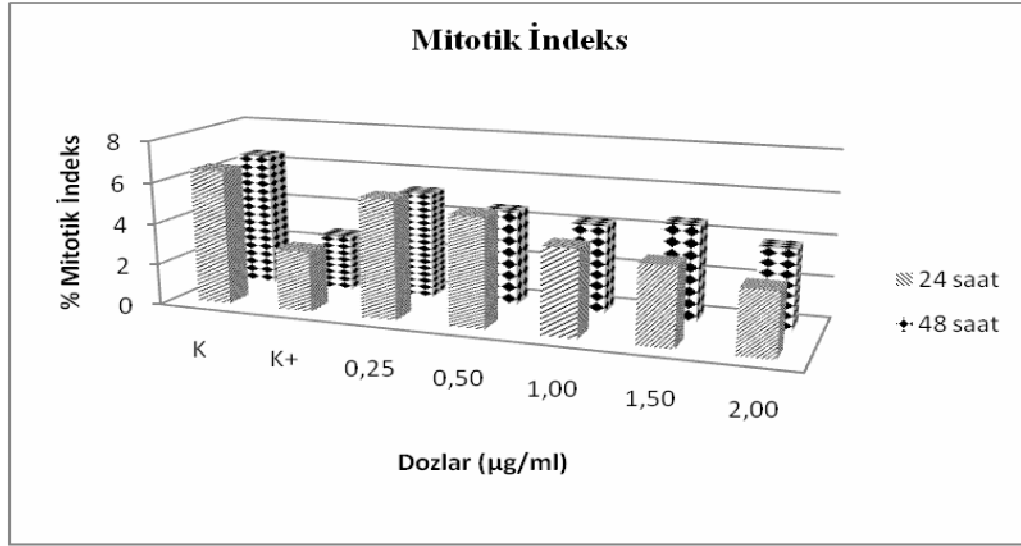
*** Kontrolle göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.7. Phorate'ın kardeş kromatid değişimi frekansı üzerine etkisi



Resim 4.6. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri



Şekil 4.8. Phorate'ın mitotik indeks üzerine etkisi

4.7. Phorate'ın MN Oluşumu ve NBİ Üzerine Etkileri

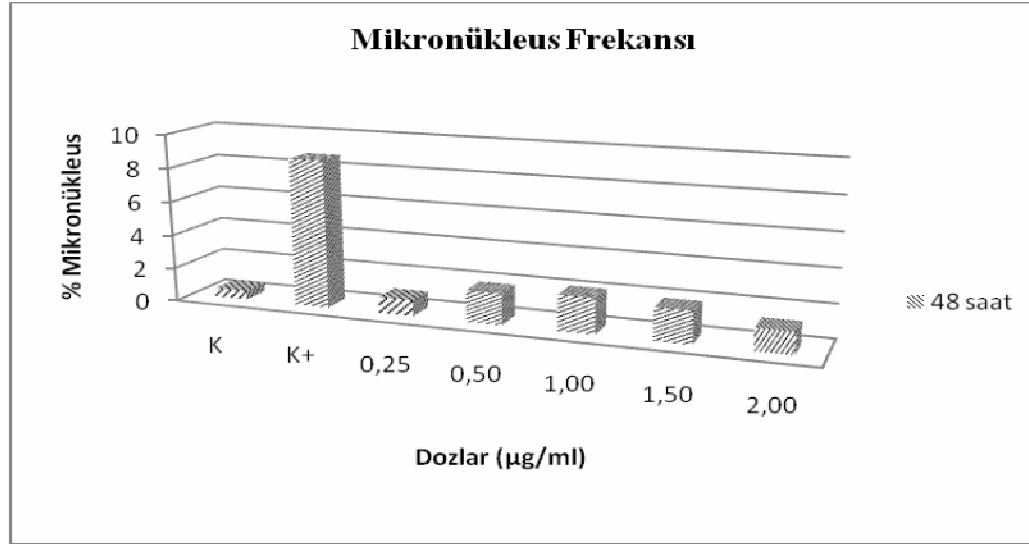
Phorate'ın mikronükleus frekansında kontrole oranla en düşük doz hariç tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı artışa sebep olduğu fakat bu artışın doza bağlı olmadığı tespit edilmiştir. En fazla artışa 1,00 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda rastlanmıştır (Çizelge 4.7, Şekil 4.9 ve Resim 4.7). En fazla bir mikronükleuslu binükleatlara rastlanmıştır. Dört ve daha fazla mikronükleus gözlenmemiştir. Nükleer bölünme indeksinde ise herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Phorate'ın insan lenfosit kültüründe MN frekansları ve NBI üzerine etkileri

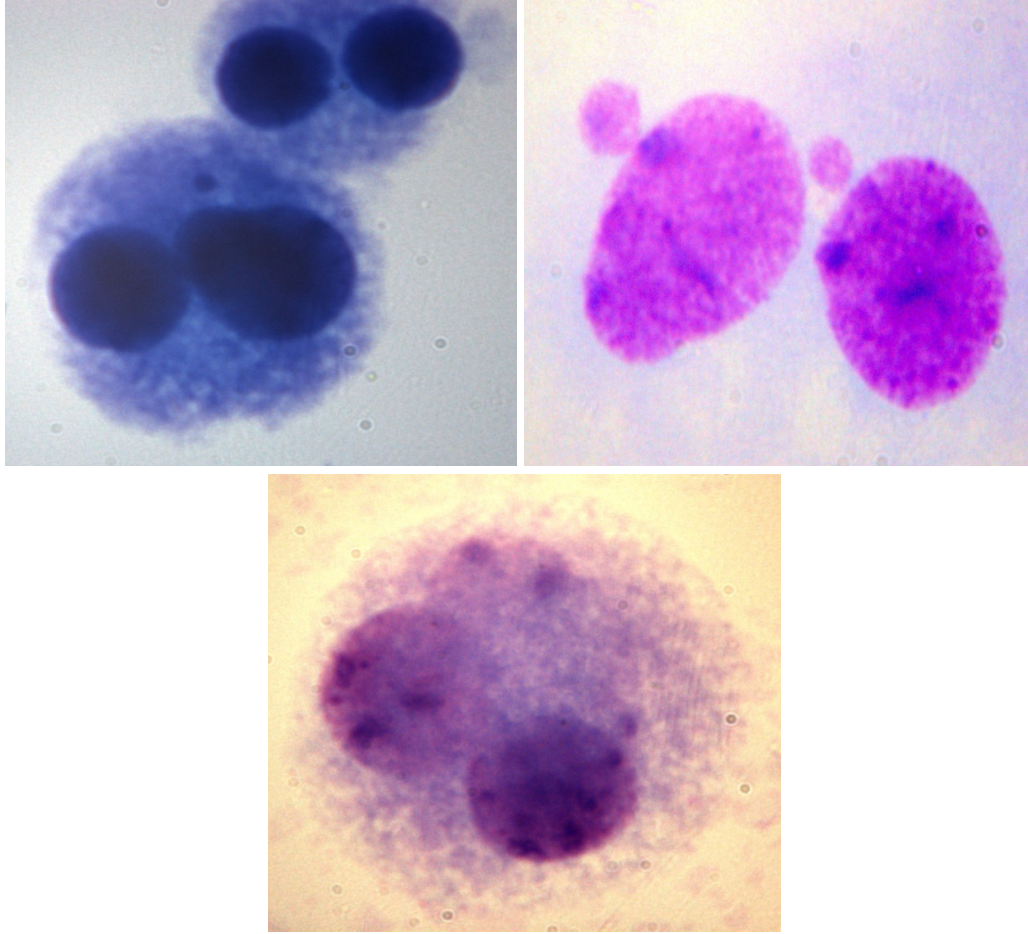
Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	Binükleat hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBI)
	Süre (saat)	Dozlar (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
	Kontrol	48	0,00	2000	10	-	-	-	0,50±0,158
MMC	48	0,20	2000	121	18	6	-	8,75±0,632	1,807±0,421
Phorate	48	0,25	2000	15	2	-	-	0,95±0,217	1,801±0,420
	48	0,50	2000	31	3	-	-	1,85±0,301***	1,742±0,413
	48	1,00	2000	36	3	-	-	2,10±0,320***	1,710±0,410
	48	1,50	2000	32	3	-	-	1,90±0,305***	1,823±0,423
	48	2,00	2000	17	3	1	-	1,30±0,253**	1,772±0,417

** Kontrole göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

***Kontrole göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.9. Phorate'ın mikronükleus frekansı üzerine etkisi



Resim 4.7. Phorate uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) bir mikronükleus b) iki mikronükleus c) üç mikronükleus

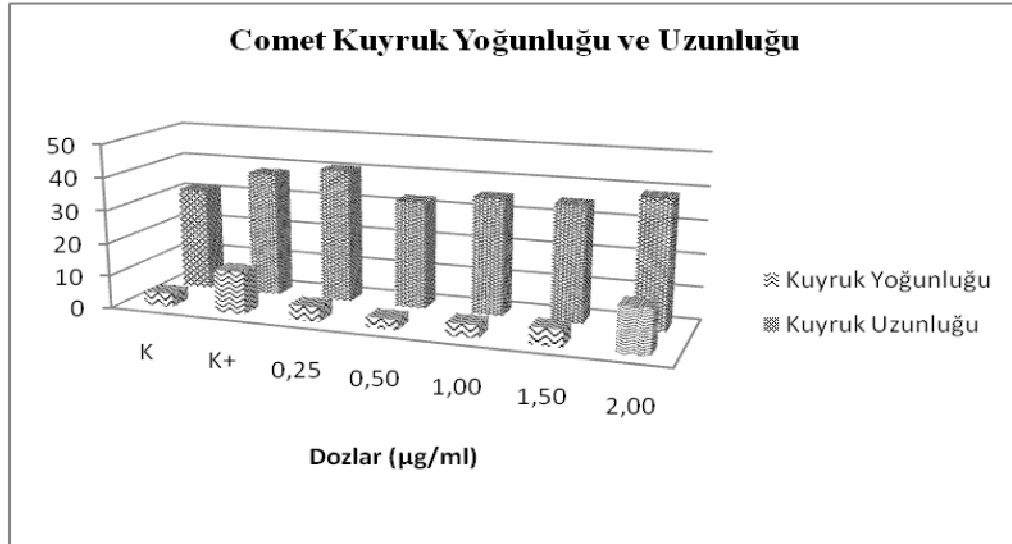
4.8. Phorate'ın Primer DNA Hasarı, Comet Kuyruk Yoğunluğu ve Kuyruk Uzunluğu Üzerine Etkileri

Phorate'ın neden olduğu DNA hasarını belirlemek için comet testi uygulanmıştır. Comet kuyruk uzunluğu tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Kuyruk yoğunluğunda ise en yüksek dozda istatistiksel olarak artış belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.10 ve Resim 4.8). Phorate'ın kuyruk yoğunluğunda sebep olduğu artış doza bağlı ($r=0,80$) iken kuyruk uzunluğunda sebep olduğu artış doza bağlı değildir.

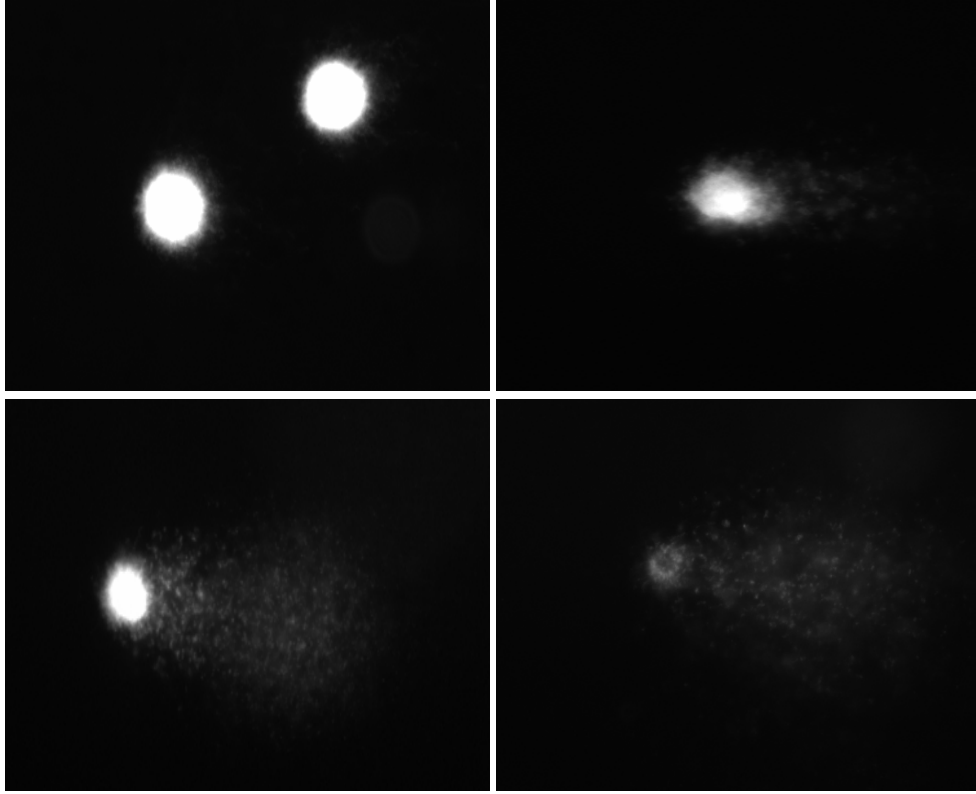
Çizelge 4.8. Phorate ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	4,05 \pm 0,98	31,50 \pm 0,49
H ₂ O ₂	0,30	12,89 \pm 1,78	38,19 \pm 1,00
Phorate	0,25	4,47 \pm 0,80	40,72 \pm 0,67*
	0,50	3,16 \pm 0,78	32,85 \pm 0,45*
	1,00	3,99 \pm 0,76	35,53 \pm 0,58*
	1,50	5,22 \pm 0,62	35,28 \pm 0,56*
	2,00	13,72 \pm 1,46*	39,03 \pm 1,03*

* Kontrole göre P < 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)



Şekil 4.10. Phorate'ın kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Resim 4.8. Phorate ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA b) az hasarlı DNA c) orta hasarlı DNA d) çok hasarlı DNA

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pestisitler tüm dünyada sadece tarım amaçlı değil günlük hayatımızda sıkça kullandığımız boya, tutkal, böcek öldürücüler vb. kimyasal ürünlerde de karşımıza çıkmaktadır. Bundan dolayı yalnız tarımla uğraşan işçiler değil diğer insanlar için de genetik açıdan risk oluşturmaktadır [Pastor ve ark., 2001].

Pestisitlere maruz kalmaya bağlı olarak non-Hodgkin's lenfoma [Hardell ve Eriksson, 1999; Zheng ve ark., 2001; Chiu ve ark., 2004], akciğer sarkoması [Blair ve ark., 1983], yumuşak doku sarkoması [Kogevinas ve ark., 1995], multiple miyolom [Khuder ve Mutgi, 1997], safra kesesi, mesane, mide, pankreas ve karaciğer kanserleri [Ji ve ark., 2001; Shukla ve ark., 2001], Alzheimer [Gauthier ve ark., 2001], Parkinson [Jenner, 2001; Sherer ve ark., 2001] ve lösemi [Brown ve ark., 1990; Blair ve Zham, 1995] gibi hastalıkların sıklığında artış tespit edilmiştir [Blair ve ark., 1983; Brown ve ark., 1990; Blair ve Zham, 1995; Kogevinas ve ark., 1995; Khuder ve Mutgi, 1997; Hardell ve Eriksson, 1999; Gauthier ve ark., 2001; Jenner, 2001; Ji ve ark., 2001; Sherer ve ark., 2001; Shukla ve ark., 2001; Zheng ve ark., 2001; Chiu ve ark., 2004].

Genotoksik etki; DNA'da hasar oluşturan etki olarak isimlendirilir. Genotoksik etkiler kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bunun sonucu olarak da geliştirilen çeşitli yöntemler sayesinde DNA'daki hasarın saptanması ile kanser riskinin belirlenmesine yardımcı olunabilmektedir [Salama ve ark., 1999].

Bundan dolayı risk altındaki nüfusların tespiti çok önemli bir konuyu teşkil etmektedir. KA, KKD, MN ve son zamanlarda DNA'ya hasar veren ajanların erkenden biyolojik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan comet testi gibi genotoksisite testlerine dikkat çekilmektedir. Pestisitlerin genotoksik etkilerinin kanıtı olarak KA, KKD, MN ve comet sonuçlarında meydana gelen önemli artışlar gösterilmektedir [De Ferrari ve ark., 1991; Amr, 1999; Au ve ark., 1999; Antonucci ve de Stylos Colus, 2000; Garaj-Vrhovac ve Zeljezic, 2000; Garaj-Vrhovac ve Zeljezic, 2001; Shaham ve ark., 2001; Zeljezic ve Garaj-Vrhovac, 2001].

Bu çalışmada, pestisitlerin kullanımında artış ve bazılarının karsinojenik ve toksik etki göstermeleri nedeniyle, günlük yaşantımızda maruz kalma ihtimalimiz olan iki insektisit *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir.

Genotoksik etkileri araştırılacak olan kimyasalların insan lenfosit kültüründeki uygulama süreleri hücre siklusu dikkate alınarak 24 veya 48 saat olarak belirlenmiştir [Hrelia ve ark., 1996]. İnsan lenfositlerinde genotoksisite çalışmalarında hücre siklusu yaklaşık olarak 24 saat olduğundan 2. ve 3. mitozların gözlenebilmesi için inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir [Çelik, 2003].

Kromozomal anormallik testinde metafaz safhasındaki hücreler incelenmiştir. Çünkü kromozom anormalliklerinin belirlenmesi en kolay metafaz evresinde olmaktadır. Çok miktarda metafaz elde edebilmek için hücre kültürüne kolkisin ekimi yapılmıştır.

Trichlorfon insektisitinin 24 saatlik uygulamanın en düşük dozu hariç tüm süre ve dozlarda kromozomal anormallik frekansını anlamlı bir şekilde artırdığı belirlenmiştir. Phorate insektisitinin ise kültüre edilmiş insan lenfositlerine uygulanması sonucu tüm doz ve sürelerde kromozomal anormallik frekansının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. En fazla sebep oldukları kromozomal anormallikler; kromatid kırığı ve kromozom kırığı olarak tespit edilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar Trichlorfon ve Phorate insektisitlerinin ikisinin de insan lenfosit kültüründe klastojenik etkili olduğunu göstermiştir.

Kromatid kırıkları kromozomun bir kromatidinde görülen yani DNA'nın çift zincirinde oluşan kırılmalar sonucu oluşan kırıklardır. Kromatid kırıklarının sebebi uygulanan maddelerin geç S veya G2 safhasında etkili olmalarıdır [Natarajan, 2002]. Sık karşılaşılan ikinci anormallik ise kromozom kırığıdır. Kromozom kırıkları kromozomların her iki kromatidinde de meydana gelen ve tamir edilememiş DNA çift zincir kırıklarıdır [Savage, 1993]. Bu durum insektisitlerin G1 safhasında da etkili olduklarını göstermektedir [Natarajan ve Obe, 1982]. Her iki kromatitte

meydana gelen DNA çift zincir kırıkları DNA'nın fosfodiester bağlarındaki kırılmalar olarak tespit edilmiştir [Topaktaş ve ark., 1996]. Her iki insektisit ayrıca kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom oluşumunu da artırdığı belirlenmiştir. Kardeş kromatidlerde birleşme genellikle kromozomun terminal kısmında meydana gelen delesyonlardır [Kayraldız ve Topaktaş, 2001; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Disentrik kromozom oluşumunda ise homolog olmayan kromozomlar arasında ya da homolog kromozomların iki uzun veya iki kısa kolu arasındaki birleşmeler etkilidir [Anderson ve Pedersen-Bjergaard, 2000]. Her iki insektisit ayrıca fragment oluşumunu indüklemiştir. Fragmentlerin pestisitlerin etkisiyle oluşan subkromatid veya kromatid kırıkları olduğu düşünülmektedir [Kaur ve Grover, 1985; Prakash ve ark., 1988]. Farklı ve aynı pestisitler ile yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucu bazı araştırmacılar kromozomal anormalliklerinin kimyasallardaki alkilleyici ajanların DNA'da sebep oldukları hasarlardan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Kimyasalların ana moleküllerinde ya da onlara ait metabolitlerin yapısında bulunan alkil ve/veya fosforil grupların (elektrofilik kısım) DNA'da bulunan nükleofilik kısma bağlanarak mutajenik aktiviteyi etkilediği belirlenmiştir [Wild, 1975; Searle, 1984; Wauchope ve ark., 1992; Giri ve ark., 2002; Çelik, 2003]. Hücre siklusunun G2 safhasında DNA'da oluşan hasarlar tamir edildiği için bu safha kromozomal anormalliklerin tespitinde önemlidir. Eğer kromozomal anormallikler artış gösteriyorsa bu safhada DNA tamirinin ya yanlış yapıldığını ya da hiç yapılmadığını göstermektedir [Rani ve Rao, 1991; Burim ve ark., 2001; Natarajan, 2002].

Beş farklı insektisitten oluşan Methoxyphosphinyl'in bileşenlerinin (Trichlorfon, Acephate, Dichlorvos, Monocrotophos ve Methamidophos) genotoksitesini belirlemek için Wang ve arkadaşları KA testini uygulamıştır. Yapılan çalışmada Trichlorfon'un 0,04; 0,2; 1,0 ve 5,0 mg/ml'lik dozları 24 saat süre CHO hücrelerine uygulanmıştır. İnsektisitlerin sebep olduğu kromozom anormalliklerinin sırası ise: Trichlorfon < Acephate < Monocrotophos < Methamidophos < Dichlorvos

şeklindedir. Bu pestisit KA artışına sebep olmadığı açıklanmıştır[Wang ve ark., 2003]. Bizim sonuçlarımızda ise Trichlorfon KA oranını önemli düzeyde artırmıştır.

Czeizel (1994) yaptığı çalışmada aralarında Trichlorfon'unda bulunduğu yedi farklı insektisite (Trichlorfon, Malathion, Methylparation, Mevinphos, Dimethoate, Dichlorvos, Diazinon) maruz kalan insanların lenfositlerindeki kromozomal anormallikleri belirlemiştir. Üç farklı zamanda alınan (zehirlenmenin 3-6. günü, 30. günü ve 180. günü) kan numunelerindeki KA değişimlerini tespit etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Trichlorfon tüm sürelerde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) bir şekilde anöploidiyi artırmıştır. Ayrıca kromatid ve kromozom tipi anormalliklerde 30. gün alınan numunede anlamlı bir artış ($p<0,05$) belirlenmiştir. Kromozom tipi anormallikler asentrik, halka ve disentrik kromozomlar olarak tespit edilmiştir [Czeizel, 1994].

Organofosfatlı Methidathion ve Triadimenol pestisitlerinin genotoksik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada insan periferik lenfositlerine her iki pestisit için de dört farklı doz (Methidathion için; 3,75; 7,50; 15,00 ve 30,00 $\mu\text{g/ml}$, Triadimenol için; 2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 $\mu\text{g/ml}$) uygulanmıştır. KA testi sonuçları Methidathion ve Triadimenol'ün tüm uygulamalarda anormal hücre frekansını kuvvetli bir şekilde artırmakla birlikte bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir. En sık rastlanan kromozom anormallikleri kromatid kırığı, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozomlar olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda da her iki pestisitinde klastojenik etkiye sebep olduğu belirtilmiştir [Demir, 2005].

Ganguly ve Bhattacharya (2006) Metacid (Organofosfatlı), Profenofos (Organofosfatlı) ve Nimbecide (Biyopestisit) pestisitlerinin genotoksik etkilerini KA yöntemi ile belirlemiştir. Sağlıklı fareler 15 gün boyunca bu üç farklı insektisit ile beslenmişlerdir. Bütün dozlar vücut ağırlığının 1 ml/100 g oranında oral olarak uygulanmıştır. Profenofos tüm konsantrasyonlarda (% 0,1; % 0,2 ve % 0,3) fare kemik iliği hücrelerinde sentrik füzyon, hiperploidi, somatik azalma, poliploidi, anafazda kromatidlerde eşit olmayan dağılım ve kromozomlarda gruplaşmada artış ortaya çıkarmıştır. Metacid ise % 0,1 konsantrasyonunda hem kromozom fragmenti

oluşumunu artırırken hem de bütün konsantrasyonlarda (% 0,1; % 0,2 ve % 0,3) asentrik kromozom oluşumunu artırmıştır. Nimbecide ise tüm konsantrasyonlarda (% 0,2; % 0,4 ve % 0,6) yalnızca kromozom fragment oluşumunu artırmıştır [Ganguly ve Bhattacharya, 2006].

Sailaja ve ark. (2006) pestisit maruz kalan işçilerdeki genotoksisteyi belirlemişlerdir. 54 pestisit işçisi ve eşit sayıda kontrol grubunun lenfositlerindeki DNA hasarlarını belirlemek için KA testi yapılmıştır. Sonuçlar kontrole göre pestisit işçilerindeki kromozomal anormallik frekansında artış olduğunu göstermiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak mesleki pestisit maruziyetinin somatik hücrelerde genetik hasara sebep olabildiği açıklanmıştır [Sailaja ve ark., 2006].

Acephate ve Mephospholan organofosfatlı insektisitler olup iki insektisitinde genotoksik etkilerini belirlemek için KA testi uygulanmıştır. İnsan lenfositlerinde yapılan çalışmada tüm uygulama süreleri (24 ve 48 saat) ve dozlarında (Acephate için 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 ve 200,0 µg/ml; Mephospholan için 0,125; 0,25; 0,50; 0,10 ve 0,20 µg/ml) KA frekansında negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir. En sık karşılaşılan anormallikler ise kromatid kırığı ve kromozom kırığı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar her iki insektisit de klastojenik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [Özkan, 2009].

Bu çalışmada kullanılan bir diğer test kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testlerinden olan kardeş kromatid değişimi testidir. Bu metod hassas ve kabul gören yöntemlerdendir [Bolognesi, 2003; Bağcı ve ark., 2005].

Birçok kimyasal ajan kardeş kromatid değişimi oluşumunu farklı şekillerde etkilemektedirler. Yapılan bazı çalışmalarda kimyasalların DNA'yı alkilleyerek polinükleotidlerde çapraz bağlar oluşmasını sağladıkları belirlenmiştir. Meydana gelen bu bağlanmalar DNA tamir mekanizması tarafından tamir edilemediği için KKD frekansında artışa sebep olmaktadır [Tuna, 1992; Wilson III ve Thompson, 2007]. KKD oluşumunda ayrıca DNA tek zincir kırıkları da etkili olmaktadır. DNA tek zincir kırıklarının önlenmesinde görev alan DNA LIG3, PARP-1 ve XRCC1

proteinlerde oluşabilecek anormallikler de kardeş kromatit değişimine neden olabilmektedir [Wilson III ve Thompson, 2007].

Kardeş kromatid değişimi testinde Trichlorfon ve Phorate için her iki uygulama süresinde ve tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca Trichlorfon'un sebep olduğu artışın doza bağlı olduğu da belirlenmiştir. Her iki insektisitinde insan lenfositlerinde DNA hasarına neden olduğu bundan dolayı mutajenik ve klastojenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Madrigal-Bujaidar ve ark. (1993) geniş spektruma sahip bir pestisit olan Trichlorfon ile aynı kimyasal olarak bilinen Metrifonate'm (Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan bir ilaç) insan lenfositlerindeki genotoksisitesini araştırmak için KKD metodunu kullanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en düşük doz hariç (10 µg/ml) diğer dozlarda (20, 30, 40, 50 ve 60 µg/ml) KKD frekansının doza bağlı olmayan bir artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda Rİ'de de en yüksek üç dozda önemli bir azalış gözlenmiştir. Fare kemik iliği hücreleri ile yapılan çalışmada ise 120 mg/kg'lık dozda KKD frekansının artış gösterdiği belirlenmiştir [Madrigal-Bujaidar ve ark., 1993]. Bu sonuç bizim sonucumuzu desteklemektedir. Çalışmamızda Trichlorfon KKD oranını artırmıştır.

Wang ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada beş farklı insektisitten oluşan Methoxyphosphinyl'in bileşenlerinin (Trichlorfon, Acephate, Dichlorvos, Monocrotophos ve Methamidophos) genotoksisitesini belirlemek için KKD yöntemini uygulamıştır. KKD frekansının Trichlorfon'da en yüksek üç dozda (0,2; 1,0 ve 5,0 mg/kg) istatistiksel ($p < 0,005$) olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca KKD frekansı şu sıra ile artış göstermiştir: Dichlorvos < Methamidophos < Monocrotophos < Trichlorfon < Acephate [Wang ve ark., 2003]. Bizim çalışmamızda da KKD frekansı tüm dozlarda önemli düzeyde artış göstermiştir.

Balaji ve Sasikala (1993) Malathion ile yaptıkları çalışmada genotoksisiteyi belirlemek için insan lenfositlerinde KKD testini uygulamışlardır. KKD frekansının

tüm dozlarda (0,02; 0,2; 2,0 ve 20,0 µg/ml) doza bağlı artış gösterdiği tespit edilmiştir [Balaji ve Sasikala, 1993].

Methidathion insektisitinin KKD frekansına etkisi araştırılmıştır. 24 saatlik uygulama süresinde en düşük doz hariç (3,75 µg/ml) diğer dozlarda istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı artış tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulamanın ise tüm dozlarında (3,75; 7,50; 15,00 ve 30,00 µg/ml) doza bağlı ve önemli artışa neden olduğu gözlenmiştir. Triadimenol uygulamasında ise tüm doz (2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 µg/ml) ve uygulama sürelerinde istatistiksel ve doza bağlı artış belirlenmiştir [Demir, 2005].

Organofosfatlı insektisitler olan Acephate ve Mephospholan ile insan lenfosit kültürlerinde yapılan KKD testi genotoksisitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. Acephate 24 saatlik uygulama sonunda KKD frekansında en düşük iki doz hariç diğer dozlarda (50,0; 100,0 ve 200,0 µg/ml), 48 saatlik uygulamanın ise en düşük doz hariç (12,5 µg/ml) diğer dozlarda istatistiksel ve doza bağlı bir artışa sebep olmuştur. Mephospholan insektisiti ise her iki uygulama süresinde ve tüm dozlarda negatif kontrole göre KKD oranında anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlar her iki insektisit de genotoksik etkiye sebep olduğunu göstermiştir [Özkan, 2009].

Yılmaz ve ark. (2008) Conan 5FL (Hexaconazole) fungusitinin insan lenfosit kültüründeki genotoksisitesini belirlemek için KKD frekansındaki değişimi incelemişlerdir. İnsan lenfositlerinde uygulanan 17,50; 35,0 ve 70,0 µg/ml'lik dozların KKD frekansını artırdığı tespit edilmiştir [Yılmaz ve ark., 2008].

Bu çalışmada ayrıca hassas ve güvenilir bir test olan MN testi de uygulanmıştır. Mikronükleuslar, asentrik fragment ve/veya mitozda kutuplara çekilememiş tam bir kromozomdan (kalgın kromozom) meydana gelmektedir. Kalgın kromozomlar kromozom uçlarında yapışkanlık veya kromozomal hareketlerin yetersizliği sonucu oluşan kromozomlardır [Ahmad ve Yasmin, 1992]. Telofaz safhasında ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafı çekirdek zarı oluşumu ile ana nükleusdan daha küçük olan mikronükleuslar oluşturur. Bu metod sadece bölünme özelliği

gösterebilen hücrelerde kullanılabilir [Dimitrov ve Gadeva, 1997; Fenech, 2000; Gömürgen, 2000].

Trichlorfon ve Phorate'ın MN testi sonuçları en düşük dozları hariç diğer dozlarda kontrole göre anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir. Trichlorfon'un sebep olduğu artış doza bağlı iken Phorate doza bağlı olmayan bir artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlara göre her iki insektisit de insan lenfositlerinde klastojenik ve anöjenik etkiye sahip olduğu düşünülmüştür.

Grover ve Malhi (1985) yaptıkları çalışmada Phorate, Ekin, Fenitrothion ve Metylparathion olmak üzere dört organofosfatlı insektisit genotoksitesini fare kemik iliği hücresinde MN testi ile belirlemişlerdir. Phorate'ın 0,25; 0,50 ve 0,75 mg/kg'lık dozları kullanılmıştır. Phorate 0,75 mg/kg'lık dozda MN frekansını artırmıştır ($p < 0,05$). Phorate ve Metylparathion mutajenik etki gösterirken Ekin zayıf mutajenite göstermiştir. Fenitrothion ise kontrole göre herhangi önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır [Grover ve Malhi, 1985]. Bizim yapmış olduğumuz çalışma sonucunda ise Phorate'ın en düşük doz hariç (0,25 $\mu\text{g/ml}$) diğer dozlarda MN frekansını önemli şekilde artırdığı belirlenmiştir.

Sailaja ve ark. (2006) 54 pestisit işçisi ve aynı sayıdaki kontrol gruplarının ağız epitel hücrelerinde MN testleri uygulamıştır. Sonuçta pestisite maruz kalan işçilerde MN frekansı kontrol grubuna göre artış göstermiştir ($p < 0,05$) [Sailaja ve ark., 2006].

Trichlorfon'la (1; 10; 20 ve 40 $\mu\text{g/ml}$) muamele edilen insan lenfositlerinde pan-sentromerik ve 2., 7. ve 18. kromozomları için sentromer problemleri kullanılan FISH tekniği ölçümlerinde kromozom kaybı ve kromozomlarda ayrılmama belirlenmiştir. Aynı çalışmada insan lenfoblastoid hücre hatlarında (AHH-1 ve MCL-5) Trichlorfon'un sebep olduğu anöjenik aktiviteyi belirlemek için MN testi kullanılmıştır. MN frekansının doza bağlı artış gösterdiği belirlenmiştir [Doherty ve ark., 1996]. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada Trichlorfon'un MN frekansını en düşük doz hariç diğer dozlarda artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca en yüksek dozda ise toksik etki belirlenmiştir.

Tian ve ark. (2000) Trichlorfon'un sebep olduğu sitogenetik ve gelişimsel etkileri belirlemek için fare zigotlarında tek doz ile (100 veya 200 mg/kg) gebeliğin 3., 9. ve 17. günlerindeki değişimleri gözlemlemiştir. Embriyonun 3. gününde MN ve 9. gününde monosomik veya trisomik hücre hatlarındaki mozaik anöploidi frekansları kontrole göre önemli bir artış göstermiştir [Tian ve ark., 2000].

Karbamatlı, organofosfatlı insektisitler ve piretroitleri karıştırarak kullanan 39 işçide pestisite maruziyet ile oluşan MN frekansları araştırılmıştır. Ayrıca pestisitlere maruziyetin mevsimle ilgili olabileceğini düşünerek biri yüksek maruziyet olabilecek dönem olan ilkbahar-yaz diğeri düşük maruziyet olabilecek dönem olan sonbahar-kış olmak üzere iki farklı zamanda iki farklı kan numunesi alınmıştır. Periferal kan lenfositlerinde MN tekniği ile binükleat hücre mikronükleus (BNMN) frekansı ve nükleer bölünme indeksi (NBİ=Sitokinezi durdurularak çoğalma indeksi=CBPI) araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre BNMN her iki döneminde de önemli istatistiksel bir fark göstermemiştir. NBİ ise mevsime bağlı ve istatistiksel artış göstermiştir [Pastor ve ark., 2002].

Methidathion ve Triadimenol pestisitlerinin insan periferal lenfositlerinde yapılan araştırmada Methidathion insektisitinin en düşük dozu (3,75 µg/ml) hariç diğer dozlarında negatif kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir. Triadimenol'de ise bütün dozlar negatif kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar her iki pestisitinde anöjenik ve klastojenik etkili olduğunu göstermektedir [Demir, 2005].

Acephate ve Mephospholan ile insan lenfositlerindeki genotoksik etkiyi belirlemek için MN testi uygulanmıştır. Acephate insektisiti MN frekansını doza bağlı olarak önemli oranda artırmıştır. Bu artış tüm dozlarda belirlenmiştir. Mephospholan ise en yüksek üç dozda (0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml) anlamlı ve doza bağlı bir artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlar her iki insektisitinde genotoksik etkiye sebep olduğunu göstermiştir [Özkan, 2009].

Bu çalışmada ayrıca Trichlorfon ve Phorate insektisitlerinin mitotik indeksteki değişimleri de tespit edilmiştir. Buna göre Trichlorfon'un 24 saatlik uygulamanın 9,38 ve 18,75 µg/ml'lik dozlarında, 48 saatlik uygulamanın ise 18,75 µg/ml'lik dozunda anlamlı bir düşüş belirlenmiştir. Phorate ise 24 ve 48 saatlik uygulamaların en düşük dozları hariç diğer dozlarda kontrole göre doza bağlı düşüşe neden olmuştur. Bu sonuçlar her iki insektisit de hücre bölünmesinde engelleyici yani sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Mitotik indekste görülen bu azalma hücrelerin G2 safhasına girmesini engelleme ya da ATP seviyesinde azalmaya neden olarak enerji üretim seviyesini azaltmaya sonuçta da enerji üretim merkezindeki bozukluğa bağlanmıştır [Epel, 1963; Jain ve Sarbhoy, 1988; Kayraldız ve Topaktaş, 2001]. Bunların yanı sıra DNA sentezi için gerekli, iğ oluşumundan sorumlu enzimlerin baskılanması, DNA sentezinin engellenmesi ve G2 safhasının uzaması da nedenler arasında gösterilmektedir [Van't Hof, 1968; Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006].

Methidathion ve Triadimenol pestisitleri insan periferik lenfositleri ile yapılan çalışmalar sonucunda Methidathion insektisitlerinin 24 ve 48 saatlik uygulamaların bütün dozlarında mitotik indekste negatif kontrole göre istatistiksel açıdan bir azalmaya neden olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre Methidathion insektisitinin hücre bölünmesini engellediği yani sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Triadimenol fungisiti ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarda negatif kontrole göre düşüş göstermiş olsa da sadece 20,00 µg/ml'lik dozlarda bu azalma anlamlıdır [Demir, 2005].

Acephate ve Mephospholan insektisitlerinin insan lenfositleri üzerinde hücre bölünmesine olan etkilerini belirlemek için Mİ değerleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Acephate insektisitinin 24 saatlik uygulama süresinin en düşük iki doz hariç (12,5 ve 25,0 µg/ml) diğer dozlarda; 48 saatlik uygulamanın ise en düşük doz hariç diğer dozlarında negatif kontrole göre doza bağlı bir düşüşe sebep olduğu belirlenmiştir. Mephospholan ise 24 saatlik uygulamanın 0,50; 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarında 48 saatlik uygulamanın ise 1,00 ve 2,00 µg/ml'lik dozlarında

önemli bir düşüşe sebep olmuştur. Acephate ve Mephospholan'ın hücre bölünmesi engelleyici etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [Özkan, 2009].

Metacid, Profenofos ve Nimbecide pestisitleri ile yapılan çalışmada Mİ frekansı kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir [Ganguly ve Bhattacharya, 2006].

Yılmaz ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Conan 5FL (Hexaconazole)'nin Mİ üzerindeki etkisini insan periferik lenfositlerinde 17,50; 35,0 ve 70,0 µg/ml'lik dozları ile belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Mİ değerinin tüm dozlarda anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir [Yılmaz ve ark., 2008].

Genetik etkilerin belirlenmesinde kullanılan bir kriter de replikasyon indeksidir. Hücre siklusu kinetiklerinin belirlenmesinde bir parametre olan Rİ'den sitotoksik etkileri belirlemek için faydalanılmaktadır. Trichlorfon ve Phorate'ın kültüre edilmiş insan lenfositlerinde Rİ herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir. Benzer şekilde Karathane LC [Çelik ve ark., 2005], Conan 5FL [Yılmaz ve ark., 2008], Acephate ve Mephospholan [Özkan ve ark., 2009] pestisitleri de replikasyon indeksini etkilememişlerdir [Çelik ve ark., 2005; Yılmaz ve ark., 2008; Özkan ve ark., 2009].

Çalışmada kullanılan bir diğer test ise comet testidir. Tek hücre alkali jel elektroforezi olarak da bilinmektedir. Comet testi son yıllarda geliştirilen, oldukça güvenilir bir test yöntemidir. *In vitro* ve *in vivo*'daki birçok hücrede, çeşitli maddelerin etkisi ile meydana gelen DNA hasarının kısa sürede belirlenmesinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Comet testi yönteminde kültürü yapılacak kimyasalın uzun süre uygulamaya maruz bırakılmamasına dikkat edilmiştir ve bu süre 1 saat olarak belirlenmiştir. Çünkü uzun süre kültür ortamında tutulduğunda oluşan DNA hasarları tamir edilmekte ve yeniden hasar oluşumu görülmemektedir.

Yapılan çalışmada Trichlorfon'un tüm dozlarda kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu kontrole göre istatistiksel olarak artırdığı tespit edilmiştir. Trichlorfon'un sebep olduğu bu artış kuyruk uzunluğunda doza bağlı etki gösterirken, kuyruk yoğunluğu doza bağlı olarak artış göstermemiştir. Phorate ile

yapılan comet testi sonuçlarına göre kuyruk uzunluğu tüm dozlarda istatistiksel artış gösterirken kuyruk yoğunluğunda yalnız en yüksek doz (2,00 µg/ml) anlamlı etki göstermiştir. Kuyruk yoğunluğundaki artış doza bağlı olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar her iki insektisitinde izole lenfositlerde DNA hasarı oluşturduklarını göstermektedir.

Bhalli ve ark. (2009) pamuk ekiminde pestisit püskürtme işlemi yapan işçilerle yaptıkları çalışmada comet testini kullanmışlardır. Püskürtülen organofosfatlı pestisitlerin arasında Phorate'da bulunmaktadır. Comet testi sonuçları kontrol grubuna göre (6,54±1,73 µm) kuyruk uzunluğunda istatistiksel olarak önemli bir artış olduğunu göstermiştir (14,80±3,04 µm; p<0,001) [Bhalli ve ark., 2009]. Yapmış olduğumuz çalışmada Phorate comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunda önemli düzeyde artışa sebep olmuştur.

Rahman ve ark. (2002) iki organofosfatlı insektisit olan Chloropyrifos ve Acephate ile yaptıkları *in vivo* çalışmada Swiss albino farelere oral olarak 24, 48, 72 ve 92 saat süre ile insektisitleri uygulanmıştır. Comet metodu kullanılarak kan numunelerindeki comet kuyruk uzunluğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Chloropyrifos 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde tüm dozlarda (0,28; 0,56; 1,12; 2,24; 4,48 ve 8,96 mg/kg) anlamlı artışa neden olmuştur. 72 saatlik sürenin ilk dört dozunda ve 92 saatlik sürenin bütün dozlarında önemli bir artış belirlenmemiştir. Acephate'ın bütün dozları (12,25; 24,50; 49,98; 196 ve 392 mg/kg) 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde istatistiksel artış göstermiştir. 72 saatin ilk üç dozunda ve 92 saatlik uygulama süresinin bütün dozlarında herhangi bir artış belirlenmemiştir [Rahman ve ark., 2002].

Organofosfatlı bir insektisit olan Acephate'ın insan lenfositlerinde sebep olduğu hasarlar comet testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 µM'lık dozlarda kuyruk uzunluğu kontrole göre istatistiksel artış göstermiştir. 8, 9 ve 10 µM'lık dozların ise lenfositlerde nekroza sebep olduğu belirlenmiştir [Das ve ark., 2008].

Özkan ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada Acephate insektisitinin insan lenfositlerinde sebep olduğu DNA hasarlarını belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre bu insektisit 100,00 ve 200,00 mg/ml⁻¹'lük dozlarda kuyruk uzunluğunu artırmıştır. Ayrıca kuyruk yoğunluğu en yüksek dozda anlamlı artış göstermiştir [Özkan ve ark., 2009].

Ündeğer ve Başaran (2005) yaptıkları çalışmada altı pestisitinin genotoksik etkilerini belirlemişlerdir. Çalışmada organofosfatlılar sınıfından Dimethoate ve Metil paration; karbamatlar sınıfından Propoxur ve Pirimicarb; piretroitlerden ise Cypermethrin ve Permethrin kullanılmıştır. Bu maddelerin genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde comet testi ile belirlenmiştir. Dimethoate kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğunu tüm dozlarda (10; 50; 100 ve 200 µg/ml) istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır. Metil paration kuyruk uzunluğunu 10, 50 ve 200 µg/ml'lik dozlarda artırırken, kuyruk yoğunluğunu 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda artırmıştır. Propoxur kuyruk uzunluğunda tüm dozlarda (10; 50; 100 ve 200 µg/ml) artışa neden olmuştur. Kuyruk yoğunluğu ise 50, 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda artış göstermiştir. Pirimicarb ise kuyruk uzunluğunu en yüksek (200 µg/ml'lik) dozda, kuyruk yoğunluğunu ise en düşük (10 µg/ml) ve en yüksek (200 µg/ml) dozlarda artırmıştır. Cypermethrin pestisiti ise 50 ve 200 µg/ml'lik dozlarda kuyruk uzunluğunu artırırken, 10 ve 200 µg/ml'lik dozlarda kuyruk yoğunluğunda artışa sebep olmuştur. Son pestisit olan Permethrin ise kuyruk uzunluğunu 50 ve 200 µg/ml'lik dozlarda artırmıştır. Kuyruk yoğunluğunu ise 10 ve 200 µg/ml'lik dozlarda anlamlı olarak artırmıştır [Ündeğer ve Başaran, 2005].

Bu araştırma sonucunda Trichlorfon ve Phorate'ın insan periferik lenfositlerinde mutajenik, klastojenik, anöjenik ve DNA hasarına sebep oldukları tespit edilmiştir. Fakat bu çalışmanın etkilerinin daha detaylı belirlenebilmesi için başka test sistemleri ile *in vivo* olarak araştırmalar yapılması gerekmektedir. Her gün istemli veya istemsiz olarak insanların maruz kaldığı pestisitlerin pek çoğunun toksisite testleri araştırılmayı beklemektedir. Kullanılmakta olan bu pestisitlerin asıl amacı çeşitli zararlıları öldürmek ve üretimi artırmak olsa da büyük bir dezavantaj olarak karşımıza hedef dışı canlılarda sebep olduğu ölümler, zehirlenmeler, teratojenik ve

kanserojenik etkiler çıkmaktadır. Son zamanlarda artan kanser vakaları ve sakat doğumlar da bu sonuçları desteklemektedir.

Pestisitlerin sebep olduğu hasarların önüne geçebilmek için kullanıcıların bilinçlendirilmesi ayrıca yapılan çalışmalar doğrultusunda toksik etki gösteren kimyasalların kullanımdan kaldırılması ya da kullanımının kısıtlanması gerekmektedir. Bunun için de devlet, üretici ve tüketici işbirliğinin pekiştirilmesi gerekmektedir. Günümüzde kullanımı artan sentetik pestisitlerin yerine çiftçiler biyoinsektisit kullanımına teşvik edilmelidir. Son zamanlarda devamlı sözü edilen organik tarım ve organik ürünler hakkında da tüketicinin bilgilendirilmesi önemli bir yer tutmaktadır.

Meyve ve sebzelerde hasara sebep olan canlıların yok edilmesi için onlarla beslenen canlıların avlanması kontrol altına alınmalı ve düzenli olarak denetlemeleri yapılmalıdır. Böylece pestisit kullanımının biraz da olsa önüne geçilebilir ve doğal denge korunmuş olur.

KAYNAKLAR

Ahmad, S., Yasmin, R., “Effects of methyl parathion and tri-miltox on the mitosis of *Allium cepa*”, *Cytologia*, 57 (1): 155-160 (1992).

Akın, A., “Bazı gıda katkı maddelerinin *Salmonella* mikrozom test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-15 (1990).

Akkuş, İ., “Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri”, *Mimoza Yayınları*, 38(5) : 1-123 (1995).

Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers”, *J. Appl. Toxicol.*, 26: 10-15 (2006).

Ames, B.N., Mccann, J., Yamasaki, E., “Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test genotoxicity”, *Mutat. Res.*, 31: 347-364 (1975).

Amr, M.M., “Pesticide monitoring and its health problems in Egypt, a Third World country”, *Toxicol. Lett.*, 107(1-3): 1-13 (1999).

Anderson, M.K., Pedersen-Bjergaard, J., “Increased frequency of dicentric chromosomes in therapy-related MDS and AML compared to *de novo* disease is significantly related to previous treatment with alkylating agents and suggests a specific susceptibility to chromosome breakage at the centromere”, *Leukemia*, 14 (1): 105-111 (2000).

Anonim, “Ürün Çalışma Grubu'nun iyi tarım teknikleri uygulamaları (EUREPGAP)”, *Akdeniz Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği, ARGE Dış İlişkileri Şube Müdürlüğü Raporu*, 36 (2004).

Antonucci, G.A., de Stylos Cólus, I.M., “Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides”, *Teratogen. Carcin. Mut.*, 20(5): 265-272 (2000).

Anwar, W.A., Salama, S.I., Serafy, M.M.E.I., Hemida, S.A., Hafez, A.S., “Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs”, *Mutagenesis*, 4: 315-317 (1994).

Au, W.W., Sierra-Torres, C.H., Cajas-Salazar, N., Shipp, B.K., Legator, M.S., “Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility”, *Environ. Health Persp.*, 107: 501-505 (1999).

Bağcı, H., Bağcı, G., Açıkbaz, İ., Demir, G., “*In vitro* testing for genotoxicity of 4-CPA by sister chromatid exchange in human lymphocyte culture”, *Turk. J. Med. Sci.*, Tübitak, 35: 75-78 (2005).

Balaji, M., Sasikala, K., “Cytogenetic effect of malathion in *in vitro* culture of human peripheral blood”, *Mutat. Res.*, 301: 13-17 (1993).

Bhalli, J.A., Ali, D., Asi, M.R., Khalid, Z.M., Ceppi, M., Khan, Q.M., Nasim, A., “DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 50: 37-45 (2009).

Blair, A., Grauman, D.J., Lubin, J.H., Fraumeni, J.F., “Lung cancer and other causes of death among licensed pesticide applicators”, *J. Natl. Cancer I.*, 71: 31-37 (1983)

Blair, A., Zahm, S.H., “Agricultural exposures and cancer”, *Environ. Health. Persp.*, 103: 205-208 (1995).

Boller, K., Schmid, W., “Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an *in vivo* test system. Hematological findings after treatment with trenimon”, *Humangenetic*, 11 (1): 35-54 (1970).

Bolognesi, C., “Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies”, *Mutat. Res.*, 543: 251-272 (2003).

Brown, L.M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L.M., Burmeister, L.F., Van Lier, S.F., Dick, F., “Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota”, *Cancer Res.*, 50: 6585-6591 (1990).

Brusick, D., “Principles Of Genetic Toxicology”, 2nd Edition, *Plenum Press*, Newyork, London, 1-277 (1987).

Bulut, H., Tamer, A., “Pestisit kullanımının azaltılması ile ilgili politika ve stratejiler”, *II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu*, Ankara, 12-24 (1996).

Burim, R.V., Canalle, R., Lopes, J.L.C., Vichnewski, W., Takahashi, C.S., “Genotoxic action of the sesquiterpene, lactone centratherin on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*”, *Teratogen. Carcin. Mutagen.*, 21: 383-393 (2001).

Chen, H.H., Hsuch, T.L., Sirianni, S.R., Huang, C.C., “Induction of sisterchromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides”, *Mutat. Res.*, 88: 307-316 (1981).

Chiu, B. C-H., Weisenburger, D.D., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Gapstur, S.M., Holmes, F., Burmeister, L.F., Blair, A., “Agricultural pesticide use, familial cancer and risk of non-hodgkin lymphoma”, *Cancer Epidem. Biomar.*, 13 (4): 525-531 (2004).

Cicchetti, R., Bari, M., Argentin, G., “Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an *in vivo* study in mice”, *Mutat. Res.*, 439: 239-248 (1999).

Committee on Updating of Occupationally Exposure Limits, a committee of the Health Council of the Netherlands, “Health-based Reassessment of Administrative Occupational Exposure Limits, *The Hague*, 3-24 (2003).

Coppage, D.L., “Characterization of fish brain acetylcholinesterase with an automated pH stat for inhibition studies”, *B. Environ. Contam. Tox.*, 6 (4): 304-310 (1971).

Countryman, P.J., Heddle, J.A., “The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 41: 321-332 (1976).

Czeizel, A.E., Elek, C., Gundy, S., Météneki, J., Nemes, E., Reis, A., Sperling, K., Tímár, L., Tusnády, G., Virágh, Z., “Environmental trichlorfon and cluster of congenital abnormalities”, *Lancet*, 341: 539-542 (1993).

Czeizel, A.E., “Phenotypic and cytogenetic studies in self-poisoned patients”, *Mutat. Res.*, 313: 175-181 (1994).

Çakmak, G., “Trafik polisi ve taksi sürücüleri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferel lenfositlerde kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-107 (2000).

Çelik, M., “Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferel lenfositlerinde sitogenetik etkileri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-102 (2003).

Çelik, M., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Ergün, M.A., Aslan, O., Kasap, R., “*In vitro* effect of karathane LC (dinocap) on human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 20 (2): 101-104 (2005).

Das, P., Shaik, A.P., Jamil, K., “Cytotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide acephate on cultured human peripheral blood lymphocytes”, *The Intern. J. Toxicol.*, 5 (2), ISSN: 1559-3916 (2008).

Dean, B.J., Danford, N., “Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells”, (in: Venitt, S., Parry, J.M., Eds.), *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, *IRL Press*, Oxford, 187-232 (1984).

Dedek, W., Scheufler, H., Fischer, G.W., “The mutagenicity of desmethyltrichlorphone in dominant lethal test on mice”, *Arch. Toxicol.*, 33: 163-168 (1975).

De Ferrari, M., Artuso, M., Bonassi, S., Bonatti, S., Cavalieri, Z., Pescatore, D., Marchini, E., Pisano, V., Abbondandolo, A., “Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 260: 105-113 (1991).

Degraeve, N., Chollet, M.C., Moutschen, J., “Mutagenic efficiency of organophosphorus insecticides used in combined treatments”, *Environ. Health Persp.*, 60: 395-398 (1985).

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A., “Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları”, *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara, 2: 629-648 (2005).

Demir, H., “Methidathion ve triadimenol pestisitlerinin insan lenfosit kültüründeki genotoksik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-77 (2005).

Dhingra, A.K., Grover, I.S., Adhikari, N., “Chromosomal aberration and micronuclei assays of some systemic pesticides in bone marrow cells”, *Nucleus*, 33: 9-14 (1990).

Dimitrov, B., Gadeva, P., “Genotoxicity studies on the insecticide dursban in root meristem cells of *Crepis capillaris L.*”, *Environ. Exp. Bot.*, 37: 199-209 (1997).

Dimitrov, B.D., Gadeva, P.G., Benova, D.K., Bineva, M.V., “Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems”, *Mutagenesis*, 21 (6): 375-382 (2006).

Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M., Parry, J.M., “A study of the aneugenic activity of trichlorfon detected by centromere-specific probes in human lymphoblastoid cell lines”, *Mutat. Res.*, 372: 221-231 (1996).

Duhova, V., “Clastogenetic effect of supercypermethrine on *Vicia faba L.* and *Hordeum vulgare L.*”, Acta Facultates Rerum Naturalium Univercitatıs Comenianae”, *Genetica et Biologia- Mole.*, 24-25, 67-74 (1993)

Dursun, O., Taç, G., Eskin, A., Yörük, B., Serçebay, U., Sarı, S., “*Trialeurodes vaporariorum westfood* (Hom.: Aleyrodidae) üzerinde bazı böcek gelişim düzenleyicilerin (IGR) etkisi”, *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5 (2): 25-32 (2008).

Dündar, Y., Aslan, R., “Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar”, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları*, 29: 95-101 (2000).

- Dzwonkowska, A., Hubner, H., "Induction of chromosomal aberrations in the syrian hamster by insecticides tested *in vivo*", *Arch. Toxicol.*, 58: 152-156 (1986).
- Edwards, C.A., "Environmental pollution by pesticides", *Plenum Press*, London and New York, 3: 542 (1973).
- Ekebaş, S., Çakir, S., Ertuğrul, O., Kence, A., "The detection of mutagenic activity of some chemicals (azamethyphos, dichlorvos, methyl parathion, aflatoxinB1) by SMART *Drosophila melanogaster*", *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 24 (6): 563-569 (2000).
- Evans, H.J., Neary, G.J., Williamson, F.S., "The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei", *Intl. J. Radiat. Biol.*, 1: 216-229 (1959).
- EPA, "Summary of OPP reduced- risk pesticides initiative", *US EPA*, 2: 19-21 (1999).
- EPA, "Fiscal year 1999 work plan", *USA EPA*, 4 (1999).
- Epel, D., "The effects of carbon monoxide inhibition on ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin egg", *J. Cell Biol.*, 17: 315-319 (1963).
- European Commission (EC), "Opinion on human and wildlife health effects endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods", (*CSTEE*) *Reports of the Scientific Committee on toxicity, ecotoxicity and environment*, Brussel, 5-96 (1999).
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., "The comet assay: a comprehensive review", *Mutat. Res.*, 339 (1): 37-59 (1995).
- Falakalı, B., "*Drosophila* Genetiği", *Ege Üniversitesi Yayınları*, Bornova, İzmir, 64-65 (1990).
- Falck, G., Catalán, J., Norppa, H., "Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin-B", *Mutat. Res.*, 392 (1-2): 71-79 (1997).
- Fenech, M., Morley, A.A., "Measurement of micronuclei in lymphocytes", *Mutat. Res.*, 147 (1-2): 29-36 (1985).
- Fenech, M., "The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285: 35-44 (1993).

- Fenech, M., "The *in vitro* micronucleus technique", *Mutat. Res.*, 455: 81-95 (2000).
- Fenech, M., "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death", *Mutat. Res.*, 600: 58-66 (2006).
- Fiskesjö, G., "The *Allium* test as a standard in environmental monitoring", *Hereditas*, 102: 99-112 (1985).
- Ford, J.H., Schultz, C.J., Correll, A.T., "Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy", *Am. J. Hum. Genet.*, 43: 733-740 (1988).
- Frölich, A., Würgler, F.E., "*Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Mutat. Res.*, 234: 71-80 (1990).
- Galloway, S.M., Wolff, S., "The relation between chemically induced sister chromatid exchanges and chromatid breakage", *Mutat. Res.*, 61 (2): 297-307 (1979).
- Ganguly, S., Bhattacharya, S., "Cytogenetic effects of pesticides in Mice (*Mus musculus*)", *Cytologia*, 71 (4): 419-423 (2006).
- Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., "Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: Pesticide genotoxicity revealed by comet assay", *Mutat. Res.*, 469: 279-285 (2000).
- Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., "Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides", *Toxicology*, 165: 153-162 (2001).
- Gauthier, E., Fortier, I., Courchesne, F., Pepin, P., Mortimer, J., Gauvreau, D., "Environmental pesticide exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a case-control study", *Environ. Res.*, 86: 37-45 (2001).
- Giri, S., Prasad, S.B., Giri, A., Sharma, G.D., "Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*", *Mutat. Res.*, 514: 223-231(2002).
- Gömürgen, A.N., "Cytological effect of the herbicide 2,4-D isooctylester 48% on root mitosis of *Allium cepa*", *Cytologia*, 65: 383-388 (2000).
- Grover, P., Danadevi, K., Mahboob, M., Rozati, R., Saleha Banu, B., Rahman, M.F., "Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the comet assay", *Mutagenesis*, 18 (2): 201-205 (2003).

Grover, I.S., Malhi, P.K., “Genotoxic effects of some organophosphorus insecticides I. Induction of micronuclei in bone marrow cells in rat”, *Mutat. Res.*, 155: 131-134 (1985).

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., “Pestisitler”, *T.C. Sağlık Bakanlığı, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*, Ankara, 52: 169 (1997).

Gürsoy, S., “Besinlerde katkı maddelerinin kullanımı ve sitrik asit toksisitesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-21 (2001).

Hardell, L., Eriksson, M., “A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides”, *Cancer*, 85: 1353-1360 (1999).

Heddle, J.A., “A rapid test for chromosome damage”, *Mutat. Res.*, 18: 187-190 (1973).

Helvacı, N.D., “Methidathion insektisinin *Allium cepa L.* kök ucu hücrelerinde sitogenetik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2-25 (2003).

Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J.A., Navas, P., Garcia-Herdugo, G., “Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by propham and chlorpropham”, *Cytobios*, 57: 7-14 (1989).

Hill, E.F., Fleming, J.W., “Acetylcholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning”, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1: 27-38 (1982).

Hrelia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Vigagni, F., Cantelli-Forti, G., “Cytogenetic effects of Metalaxyl on human and animal chromosomes”, *Mutat. Res.*, 369: 81-86 (1996).

Högstedt, B., Karlsson, A., “The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used”, *Mutat. Res.*, 156: 229-232 (1985).

İnternet: “Tarımsal Kirlilikte Pestisit Kirliliği”, <http://www.agri.ankara.edu.tr/irrigation> (2009).

İnternet: “Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü İstatistik Verileri”, www.kkgm.gov.tr (2008).

İnternet: “Ziraat Mühendisleri Odası”, <http://www.zmo.org.tr/genel> (2008).

Jain, A.K., Sarbhoy, R.K., “Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides: III. Concluding remarks”, *Cytologia*, 53: 427-436 (1988).

Jenner, P., “Parkinson’s disease, pesticides and mitochondrial dysfunction”, *Trends Neurosci.*, 24 (5): 245-246 (2001).

Ji, B.T., Silverman, D.T., Stewart, P.A., Blair, A., Swanson, G.M., Baris, D., Greenberg, R.S., Hayes, R.B., Brown, L.M., Lillemoe, K.D., Schoenberg, J.B., Pottern, L.M., Schwartz, A.G., Hoover R.N., "Occupational exposure to pesticides and pancreatic cancer", *Am. J. Ind. Med.*, 39 (1): 92-99 (2001).

Johnson, F.M., "How many high production chemicals are rodent carcinogens? Why should we care? What do we need to do about it?", *Mutat. Res.*, 543: 201-215 (2003).

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., "Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies", *Mutat. Res.*, 463: 13-31 (2000).

Kaur, P., Grover, I.S., "Cytological effects of some organophosphorus pesticides I. mitotic effects", *Cytologia*, 50: 187-197 (1985).

Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A., "Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji", *Medisan Yayın Serisi: 35*, Ankara, 222, 232, 273, 276, 355 (1998).

Kaya, S., "Pestisitler", Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, 2. Baskı (Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A., Editörler), *Medisan Yayın Serisi 53*, Ankara, 385-536 (2002).

Kayraldız, A., Topaktaş, M., "Indirect genotoxic effect of gamma rays in human peripheral lymphocytes", *Cytologia*, 66: 25-31 (2001).

Kehrer, J.P., "Free radicals as mediators of tissue injury and disease", *Crit. Rev. Toxicol.*, 23: 21-48 (1993).

Khuder, S.A., Mutgi, A.B., "Meta-analyses of multiple myeloma and farming", *Am. J. Ind. Med.*, 32: 510-516 (1997).

Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., "Handbook of mutagenicity test procedures", *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, 28-29 (1984).

Kimura, K., Sakurada, K., Katoh, N., "Inhibition by gossypol of phospholipid-sensitive Ca⁺² dependent protein kinase from pig testis", *Biochim. Biophys. Acta.*, 839 (3): 276-280 (1985).

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

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutat. Res.*, 540: 153-163 (2003).

Klinkhardt, M.B., "Chromosomes as sensitive toxicity indicators, possibilities and limits", *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*, 45-55 (1993).

Kocaman, A.Y., Topaktaş, M., "The *in vitro* genotoxic effects of a commercial formulation of α -cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes", *Environ. Mol. Mutagen.*, 50 (1): 27-36 (2008).

Koçak, A., Şenol, E., Kök, H.O., Aktaş, E.Ö., "Organofosfat (Tamaron) zehirlenmesi sonrasında gelişen nöropati", *J. Foren. Med.*, 2: 109-112 (2005).

Kogevinas, M., Kauppinen, T., Winkelmann, R., Becher, H., Bertazzi, P.A., Buende-Mesquita, H.B., Coggon, D., Green, L., Johnson, E., Littorin, M., Lyng, E., Marlow, D.A., Mathews, J.D., Nevberger, M., Benn, T., Pannett, B., Pearce, N., Saracci, R., "Soft tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins: two nested case-control studies", *Epidemiology*, 6: 396-402 (1995).

Lin, M.F., Wu, C.L., Wang, T.C., "Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells", *Mutat. Res.*, 188: 241-250 (1987).

Lotti, M., "Cholinesterase inhibition: Complexities in interpretation", *Clin. Chem.*, 41 (12): 1814-1818 (1995).

Madrigal-Bujaidar, E., Reyes Cadena, S., Trujillo-Valdés, V.M., Cassani, M., "Sister-chromatid exchange frequencies induced by metrifonate in mammalian *in vivo* and *in vitro* systems", *Mutat. Res.*, 300: 135-140 (1993).

Madrigal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A., Chamorro, G., "Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed *in vivo*", *Food Chem. Toxicol.*, 39 (9): 941-946 (2001).

Malhi, P.K., Grover, I.S., "Genotoxic effects of some organophosphorous pesticides. II. *In vivo* chromosomal aberration bioassay in bone marrow cells in rats", *Mutat. Res.*, 188 (1): 45-51 (1987).

Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring", *Biochimie*, 88 (11): 1515-1531 (2006).

McGregor, D.B., Brown, A., Cattanaach, P., Edwards, I., McBride, D., Riach, C., Caspary, W.J., "Responses of the I5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals", *Environ. Mutagen.*, 12: 85-154 (1988).

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L, Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De M eo, M.P., Collins, A., “The single gel cell electrophoresis assay (Comet Assay): a European review”, *Mutat. Res.*, 288: 47-63 (1993).

Moran, D.M., Ames, B.N., “Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity tests”, *Mutat. Res.*, 113: 173-215 (1983).

Moutschen-Dahmen, J., Moutschen-Dahmen, M., Degraeve, N., “Metrifonate and dichlorvos: cytogenetic investigations”, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 49 (5): 29-39 (1981).

Muranlı, F.D.G., “K lt r  yapılan insan lenfositlerinde triasulfuron’un genotoksik etkileri”, Doktora Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne, 2-19 (2006).

Naravaneni, R., Jamil, K., “Determination of AChE levels and genotoxic effects in farmers occupationally exposed to pesticides”, *Hum. Exp. Toxicol.*, 26 (9): 723-731 (2007).

Natarajan, A.T., Obe, G., “Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays” (In: Heddle, J.A., Editor), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, *Academic Press*, New York, 171-213 (1982).

Natarajan, A.T., “Chromosome aberrations: past, present and future”, *Mutat. Res.*, 504: 3-16 (2002).

Nehez, M., Huszta, E., Mazzag, E., Scheufler, H., Schneider, P., Fischer, G.W., “Cytogenetic, genetic, and embryotoxicity studies with dimethyl 2,2,2-trichloro-1-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyethoxy)-ethylphosphonate, a hypothetical impurity in technical grade trichlorfon”, *Ecotox. Environ. Safe.*, 13: 216-224 (1987).

O’Brien, R.D., “Insecticides -Action and Metabolism”, *Academic Press, Inc.*, London, 332 (1974).

Ostling, O., Johanson, K.J., “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages migration from individual cells”, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 123: 291-298 (1984).

 zkan, D., “Acephate ve Mephosfolan insektisitlerinin insan lenfosit kültüründe genotoksik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-92 (2009).

 zkan, D., Y zbaşıoğlu, D.,  nal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., “Evaluation of the cytogenetic damage induced by the organophosphorous insecticide acephate”, *Cytotechnology*, 59: 73-80 (2009).

- Palitti, F.C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricordy, R., Vitagliana, A., Fiore, M., “Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogonial cell of mice”, *Mutat. Res.*, 103: 191-195 (1982).
- Pandita, T.K., Khoshoo, T.N., “Mutagenicity testing of Thimet 10-G”, *Nucleus*, 27: 168-171 (1984).
- Pandita, T.K., “Evaluation of Thimet 10-G for mutagenicity by 4 different genetic systems”, *Mutat. Res.*, 171: 131-138 (1986).
- Parlak, Ş., “Gıda koruyucu maddesi olan bifenil’in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-72 (2007).
- Pastor, S., Gutiérrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A., Marcos, R., “Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides”, *Mutat. Res.*, 495:147-156 (2001).
- Pastor, S., Lucero, L., Gutiérrez, S., Durbán, R., Gómez, C., Parrón, T., Creus, A., Marcos, R., “A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides”, *Mutagenesis*, 17 (1): 79-82 (2002).
- Pastor, S., Creus, A., Parrón, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S., Marcos, R., “Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers”, *Mutagenesis*, 18 (3): 249-258 (2003).
- Perry, P., Evans, H.J., “Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange”, *Nature*, 258: 121-125 (1975).
- Perry, P.E., Thomson, E.J., “The Methodology of Sister Chromatid Exchanges”, 2 nd Edition, (Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam, 495-529 (1984).
- Prakash, N.S., Lakshmi, N., Harini, I., “Cytological effects of agricultural chemicals: II. Effects of fungicides Bavistin and Deltan on chilli (*Capsicum annuum L.*)”, *Cytologia*, 53: 709-715 (1988).
- Preziosi, P., “Natural and antropogenic environmental oestrogens: The scientific basis for risk assessment. Endocrine disruptors as environmental signalers”, *Pure Appl. Chem.*, 70: 1617-1631 (1998).
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., “*Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay”, *Mutat. Res.*, 650 (2): 202-209 (2008).

- Rahman, M.F., Mahboob, M., Danadevi, K., Saleha Banu, B., Grover, P., "Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes", *Mutat. Res.*, 516: 139-147 (2002).
- Rani, M.V.U., Rao, M.S., "In vitro effect of fenthion on human lymphocytes", *B. Environ. Contam. Tox.*, 47: 316-320 (1991).
- Rank, J., Nielsen, M.H., "A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures", *Hereditas*, 118: 49-53 (1993).
- Raposo, A., Carvalho, C.R., Otoni, W.C., "Statistical and image analysis of sister chromatid exchange in maize", *Hereditas*, 141 (3): 318-322 (2004).
- Ronaldi, R., Gambuti, G., Eichenlaub-Ritter, U., Pacchierotti, F., "Trichlorfon effects on mouse oocytes following *in vivo* exposure", *Mutat. Res.*, 651: 125-130 (2008).
- Ross, G.M., McMillan, T.J., Wilcox, P., Collins, A.R., "The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) technical aspects and applications: Report of the Fifth LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer research 1994", *Mutat. Res.*, 337: 57-60 (1995).
- Rydberg, B., Johanson, K.J., "DNA repair Mechanism", Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, (In Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C., Fox, C.F., Eds.), *Academic Press*, New York, 465-468 (1978).
- Sailaja, N., Chandrasekhar, M., Rekhadevi, P.V., Mahboob, M., Rahman, M.F., Vuyyuri, S.B., Danadevi, K., Hussain, S.A., Grover, P., "Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production", *Mutat. Res.*, 609 (1): 74-80 (2006).
- Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., "Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment", *Mutat. Res.*, 436: 99-112 (1999).
- Sardaş, S., Karakaya, A.E., "Clastogenicity test; sister chromatid exchange", *J. Fac. Pharm.*, Gazi, 7 (2): 91-104 (1990).
- Sarıkaya, R., "Sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat'ın genotoksik etkisinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması", Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-110 (2005).
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., "The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives", *Mutat. Res.*, 519 (1-2): 103-119 (2002).
- Savage, J.R.K., "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 198-207 (1993).
- Searle, C.E., "Chemical carcinogenesis", *Am. Chem. Soc. Monogr.*, 182 (1984).

Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R., Levi, Z., "Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides", *Mutat. Res.*, 491: 71-80 (2001).

Sherer, T.B., Betarbet, R., Greenamyre, T., "Pathogenesis of Parkinson's disease", *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2: 657-662 (2001).

Shukla, V.K., Rastogi, A.N., Adukia, T.K., Raizada, R.B., Reddy, D.C., Singh, S., "Organochlorine pesticides in carcinoma of the gallbladder: a case-control study", *Eur. J. Cancer Prev.*, 10:153-156 (2001).

Simmon, V.F., Mitchell, A.D., Jorgenson, T.A., "Evaluation of selected pesticides as chemical mutagens in *in vitro* and *in vivo* studies", *Stanford Research Institute*, Menlo Park CA, USA, 6-253 (1987).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191 (1988).

Sobti, R.C., Krishan, A., Pffaffenberger, C.D., "Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro*: Organophosphates", *Mutat. Res.*, 102: 89-102 (1982).

Speit, G., Houpter, S., "On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substitute chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns", *Hum Genet.*, 70: 126-129 (1985).

Sun, F.Y., Schmid, T.E., Schmid, E., Baumgartner, A., Adler, I.D., "Trichlorfon induces spindle disturbances in V79 cells and aneuploidy in male mouse germ cells", *Mutagenesis*, 15: 17-24 (2000).

Sun, F., Betzendahl, I., Van Wemmel, K., Cortvrindt, R., Smits, J., Pacchierotti, F., Eichenlaub-Ritter, U., "Trichlorfon-induced polyploidy and nondisjunction in mouse oocytes from preantral follicle culture", *Mutat. Res.*, 651: 114-124 (2008).

Taylor, J.H., "Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes", *Genetics*, 43: 515-529 (1958).

Thilager, A., Kumaroo, V., "Test for chemical induction of gene mutation at the *hprt* locus in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells with and without metabolic activation", *Sitek Research Laboratories*, Rockville MD, USA, Yayınlanmamış Rapor (1985).

Tian, Y., Ishikawa, H., Yamauchi, T., "Analysis of cytogenetic and developmental effects on pre-implantation, mid-gestation and near-term mouse embryos after treatment with trichlorfon during zygote stage", *Mutat. Res.*, 471: 37-44 (2000).

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

Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., İla, H.B., "In vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats treated with Marshal", *Mutat. Res.*, 371: 259-264 (1996).

Tuna, M., "Akut lösemi tanılı olgularda kromozom ve kardeş kromatid değişimi analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-6 (1992).

Ünal, Y., "Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekniği ile araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-87 (1998).

Ünal, G., Gürkan, M.O., "İnsektisitler Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri", *Ethemoğlu Ofset Matbaacılık*, Ankara, 46-47, 159 (2001).

Ündeğer, Ü., Başaran, N., "Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes *in vitro*: Induction of DNA damage", *Arch. Toxicol.*, 79: 169-176 (2005).

Van Bao, T., Szabó, I., Ruzicska, P., Czeizel, A., "Chromosome aberrations in patients suffering acute organic phosphate insecticide intoxication", *Human genetic*, 24: 33-57 (1974).

Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, L., Kirsch-Volders, M., "The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens", *Mutagenesis*, 4: 6-11 (1989).

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

Van't Hof, J., "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristemS", *Exp. Cell Res.*, 51: 167-176 (1968).

Vural, N., "Toksikoloji", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Ankara, 73: 342-373 (2005).

Wang, T.C., Lee, T.C., Lin, M.F., Lin, S.Y., "Induction of sister-chromatid-exchanges by pesticides in primary rat tracheal epithelial cells and Chinese hamster ovary cells", *Mutat. Res.*, 188 (4): 311-321 (1987).

Wang, T.C., Lin, C., Lo, L., "Genotoxicity of methoxyphosphinyl insecticide in mammalian cells", *Zool. Stud.*, 42(3): 462-469 (2003).

Waters, M.D., Simmon, V.F., Mitchell, A.D., Jorgenson, T.A., Valencia, R., “An overview of short-term tests for the mutagenic and carcinogenic potential of pesticides”, *J. Environ. Sci. Health*, 15: 867-906 (1980).

Waters, M.D., Sandhu, S.S., Simmon, V.F., Mortelmans, K.E., Mitchell, A.D., Jorgenson, T.A., Jones, D.C., Valencia, R., Garrett, N.E., “Study of pesticide genotoxicity”, *Basic Life Sci.*, 21: 275-326 (1982).

Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W., Burt, J.P., “The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making”, *Rev. Environ. Contam. T.*, 123: 1-155 (1992).

Wild, D., “Mutagenicity studies on organophosphorus insecticide”, *Mutat. Res.*, 32: 133-150 (1975).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., “Molecular mechanism of sister chromatid exchange”, *Mutat. Res.*, 616 (1-2): 11-23 (2007).

Yavuz, O., Şanlı, Y., “Halk sağlığı ve vektör kontrolünde kullanılan pestisidler, pestisit formülasyonları ve uygulama seçenekleri”, *I. Seminer Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri*, 24 (1999).

Yılmaz, S., “Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 36-76 (2008).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., “Genotoxic action of fungicide Conan 5FL (hexaconazole) on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*”, *Russ. J. Genet.*, 44: (3) 273-278 (2008).

Yin, H., Cukurcam, S., Betzendahl, I., Adler, I.D., Eichenlaub-Ritter, U., “Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes”, *Chromosoma*, 107: 514-522 (1998).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, 604: 53-59 (2006).

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., “Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*”, *Mutat. Res.*, 649: 155-160 (2008).

Zeki, C., Kedici, R., Çevik, T., Halıcı, S., Er, H., “Bazı böcek büyüme düzenleyicileri ve yumurta parazitoiti *Trichogramma embryophagum* (Hortig Hym.: Trichogrammatidae)’un elma içkurdu (*Cydia pomonella* L.) (Lep.: Tortricidae)’na karşı etkinlikleri üzerinde araştırmalar”, *Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri*, 57-66 (1999).

Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., “Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides”, *Mutagenesis*, 16: 359-363 (2001).

Zeren, O., Dikmen, N., Kumbur, H., Taga, S., “İçel ilinde tarımsal kesimde çalışan kişilerin plazmalarında kolinesteraz aktivite değişiminin araştırılması”, *Türk Entomol. Derg.*, 22 (3): 199-205 (1998).

Zheng, T., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Zhang, Y., Blair, A., “Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-hodgkin lymphoma”, *J.O.E.M.*, 43: 641-649 (2001).

Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P., Salvatore, G., Carere, A, Crebelli, R., “An assessment of the *in vivo* clastogenicity of erythrosine”, *Food Chem. Toxicol.*, 32: 159-63 (1994).

Zirai Mücadele İlaçları ve Üretimi Yapılan İşyerlerinde İş Sağlığı ve Güvenliği Proje Denetimi Değerlendirme Raporu, *T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Teftiş Kurulu Başkanlığı*, 4: 1-83 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TİMOROĞLU, İlknur
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 12.02.1982, Kastamonu
Medeni hali : Bekâr
e-mail : i.timuroglu@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Tosya Anadolu Lisesi	2001

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, müzik dinlemek, resim yapmak, çiçekler ve hayvanlarla ilgilenmek.