

**BAZI PESTİSİTLERİN MUTAJENİTE VE
GENOTOKSİSİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ
Dilek AKYIL
DANIŞMAN
Prof. Dr. Muhsin KONUK
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Mart, 2012

Bu tez çalışması 10.FENED.09 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI PESTİSİTLERİN MUTAJENİTE VE GENOTOKSİSİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dilek AKYIL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Muhsin KONUK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mart, 2012

TEZ ONAY SAYFASI

Dilek AKYIL tarafından hazırlanan “Bazı pestisitlerin mutajenite ve genotoksisitelerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Muhsin KONUK

Başkan : Ünvanı, Adı ve Soyadı
..Ü.Fakültesi, İmza

Üye : Ünvanı, Adı ve Soyadı
..Ü.Fakültesi, İmza

Üye : Ünvanı, Adı ve Soyadı
..Ü.Fakültesi, İmza

Üye : Ünvanı, Adı ve Soyadı
..Ü.Fakültesi, İmza

Üye : Ünvanı, Adı ve Soyadı
..Ü.Fakültesi, İmza

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Enstitü Müdürü
(Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN)

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

beyan ederim.

07/03/2012
Dilek AKYIL

Oğlum Eren'e...

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI PESTİSİTLERİN MUTAJENİTE VE GENOTOKSİSİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Dilek AKYIL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhsin KONUK

Bu çalışmada, tarımda çok yaygın olarak kullanılan iki organik fosforlu pestisit (Chlorthiophos ve Anilofos) mutajenik etkileri Ames testi ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte maddelerin sitogenetik ve genotoksik etkileri de *in vitro* insan periferik kan lenfosit kültüründe; kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus test (MN) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Ames testinde bu maddelerin beş farklı konsantrasyonu TA97, TA98, TA100 ve TA102 olmak üzere 4 farklı suş üzerinde, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda, test edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, her iki pestisit tüm konsantrasyonları S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda TA97, TA100 ve TA102 suşlarının üçünde de

herhangi bir mutajenik aktivite göstermemiştir. Ancak Chlorthiophos tüm konsantrasyonlarda, Anilofos ise 10, 100 ve 1000 µg/plak dozlarında, TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik olarak saptanmıştır.

Periferik kan kültüründe ise, pestisitlerin 4 farklı konsantrasyonu (25, 50, 100 ve 200 µg/ml) 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır. Chlorthiophos'un bütün süre ve dozlarda KKD'yi artırmadığı, 200 µg/ml konsantrasyonunda KA'yı artırdığı belirlenmiştir. Hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sürelerinde sadece 200 µg/ml konsantrasyonda MN oluşumunu artırdığı saptanmıştır. Aynı zamanda mitotik indeksi (Mİ) ve sitokinezi-blok proliferasyon indeksi (CBPİ)'ni anlamlı olarak azaltmıştır. Fakat bu maddenin proliferasyon indeksi (Pİ)'ni etkilemediği tespit edilmiştir.

Anilofos ise her iki uygulama süresinde tüm konsantrasyonlarda KKD, Pİ ve MN oluşumunu artırmamıştır. 24 saat uygulama süresinde 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonların ve 48 saat uygulama süresinde ise 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarının KA'yı artırdığı saptanmıştır. Ayrıca Mİ ve CBPİ'yi anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hem Chlorthiophos hem de Anilofos'un her ikisi de KA'yı artırdığı için klastojenik ve aynı zamanda Mİ ve CBPİ'yi azalttıkları için de bu iki maddenin sitotoksik potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır.

2012, xiii+ 176 sayfa

Anahtar Kelimeler: Chlorthiophos, Anilofos, Ames, Kromozom Aberasyon, Kardeş Kromatid Değişimi, Mikronükleus

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF MUTAGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF SOME PESTICIDES

Dilek AKYIL

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Muhsin KONUK

In this study, we aimed to determine the mutagenic effects of two organophosphate pesticides (Chlorthiophos ve Anilofos) which are widely used in agriculture, by using Ames test. At the same time, the cytogenetic and genotoxic effects of these pesticides also determined in human peripheral blood lymphocyte culture by using chromosome aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus test (MN).

Five different concentrations of these pesticides were tested by Ames test on TA97, TA98, TA100 and TA102 strains with and without S9 metabolic activation. All concentrations of both pesticides have not shown mutagenic activity on TA97, TA100 and TA102 strains with and without S9 fraction. But, all concentrations of Chlorthiophos and 10, 100 and 1000 µg/plate concentrations of Anilofos were observed to be mutagenic on TA98 strain without S9 fraction.

The cultures were treated with four different concentrations of pesticides (25, 50, 100 and 200 µg/ml) for 24 and 48 hours. It was determined that Chlorthiophos did not increase SCE frequency in all treatment periods and concentrations, and 200 µg/ml concentration of Chlorthiophos induced the CA frequency. Its only 200 µg/ml concentrations in 24 and 48 hours treatment periods were observed to increase MN formation. In addition, this pesticide was reduced mitotic index (MI) and cytokinesis-block proliferation index (CBPI) significantly. But, Chlorthiophos did not effect the proliferation index (PI).

Anilofos did not induce SCE frequency, PI, and MN formation in all concentrations of both treatment period. It was determined that Anilofos increased CA frequency at 100 and 200 µg/ml cocentrations in 24 hours treatment periods and 50, 100, and 200 µg/ml concentrations in 48 hours treatment periods. In addition, it was determined that this pesticide was decreased MI and CBPI significantly. It was concluded that Chlorthiophos and Anilofos are clastogenic due to increasing effect in CA frequency and possible cytotoxic due to decreasing effect in MI and CBPI.

2012, xiii+ 176 pages

Key Words: Chlorthiophos, Anilofos, Ames, Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchange, Micronucleus

TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkânı sunan ve yıllar öncesinde bu konu üzerinde çalışmam için beni yönlendiren, aynı zamanda çalışmalarım süresince önerileri ile destek olan ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhsin KONUK'a teşekkür ederim.

Çalışma konusunun seçiminde bana fikir vererek beni destekleyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Elif KORCAN'a, laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını ve bilgilerini benden esirgemeyen, tezimin tamamlanmasında büyük emek sarf eden değerli arkadaşlarım Dr. Recep LİMAN ve Dr. Yasin EREN'e, deney sırasında bana yardımcı olan arkadaşlarım İmren ÇALIK, Nur Serap ÖZTÜRK ve Harun ÜSTÜNOĞLU'na, fotoğraflama konusunda yardımlarını benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Uğur Cengiz ERİŞMİŞ'e, çalışmayı öğrenmem için bana kapılarını açan Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Grv. Erman Salih İSTİFLİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında her türlü sıkıntıma ortak olan, manevi desteklerini esirgemeyen, tüm stresime göğüs geren, her zaman yardıma hazır olan ve sevginin tarifsiz kaldığı canım arkadaşlarım Arzu ÖZKARA ve S. Feyza ERDOĞMUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının yürütülmesini 10.FENED.09 no'lu proje ile maddi olarak destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Her konuda yanımda olan ve hiçbir konuda fedakârlıklarını esirgemeyen, karşılıksız destek vermenin ne demek olduğunu öğrendiğim sevgili annem ile şu an yanımda olmasa da varlığını her zaman kalbimde hissettiğim ve bu noktaya gelmemde büyük çaba sarfetmiş olan değerli babama çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar beni her konuda destekleyip, bana güvenerek her zaman yanımda olan sevgili eşim Murat AKYIL'a ve en sıkıntılı anlarımda bile bana mutluluğun tarifini hatırlatan biricik oğlum Eren AKYIL'a bu tez çalışması sırasındaki her türlü destek ve yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dilek AKYIL

AFYONKARAHİSAR, 2012

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Pestisitler	3
2.2 Organik Fosforlu Pestisitlerin Üretimi ve Kullanımı	5
2.2.1 Organik Fosforlu Pestisitlerin Etki Mekanizması	6
2.3 Çalışmada Kullanılan Organik Fosforlu Pestisitler	8
2.3.1 Chlorthiophos	8
2.3.2 Anilofos	9
2.4 Mutajenite Test Sistemleri.....	10
2.4.1 Bakteriyel Yöntemler	11
2.4.2 Sitogenetik Yöntemler	20
2.5 Literatür Özetleri	35
2.5.1 Ames Testi ile Yapılmış Olan Çalışmalar	35
2.5.2 Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Testleri ile Yapılmış Olan Çalışmalar	38
3. MATERYAL ve METOT	43
3.1 Materyal.....	43

3.1.1 Ames Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması	43
3.1.2 Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması	56
3.2 Metot.....	62
3.2.1 Ames Testi.....	62
3.2.2 Kardeş Kromatid Değişimi ve Kromozom Aberasyon Testi	69
3.2.3 Mikronükleus Testi.....	83
4. BULGULAR	89
4.1 Ames Testine Ait Bulgular	89
4.2.1 Chlorthiophos'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri.....	94
4.2.2 Chlorthiophos'un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri	97
4.2.3 Chlorthiophos'un Kromozom Aberasyonlarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri	103
4.2.4 Anilofos'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri.....	110
4.2.5 Anilofos'un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri	112
4.2.6 Anilofos'un Kromozom Aberasyonlarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri ..	114
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	117
5.1 Chlorthiophos ve Anilofos'un Ames Testi Sonuçları	117
5.2 Chlorthiophos ve Anilofos'un Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	125
6. KAYNAKLAR.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	176

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
rpm	Dakikadaki dönüş hızı
sn	Saniye
°C	Santigrad derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

ATP	Adenozin trifosfat
pH	Hidrojen potansiyeli
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
BrdUrd	5'-bromo-2'-deoxyuridine
KA	Kromozom aberasyonları
CBPI	Sitokinezi-blok proliferasyon indeksi
CHO	Çin hamster ovaryum
Cyt-B	Cytochalsin B
KKD	Kardeş kromatid değişimi
MI	Mitotik indeks
MN	Mikronükleus
IPCS	International Programme on Chemical Safety

Pİ	Proliferasyon indeksi
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin agar
MGA	Minimal glukoz agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Organik fosforlu insektisit olan Chlorthiophos'un yapısal şekli.....	9
Şekil 2.2 Organik fosforlu herbisit olan Anilofos'un yapısal şekli	9
Şekil 3.1 Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi.	78
Şekil 3.2 Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (DU)'in kimyasal yapıları.....	79
Şekil 3.3 BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması.....	81

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 4.1 <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü.....	90
Resim 4.2 <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü	90
Resim 4.3 <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun <i>rfa</i> mutasyonu kontrolü	91
Resim 4.4 <i>S. typhimurium</i> TA100 suşunun spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü.....	91
Resim 4.5 Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları.....	94
Resim 4.6 İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları	95
Resim 4.7 Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları	95
Resim 4.8 Bir nükleuslu hücre	98
Resim 4.9 İki nükleuslu hücre	99
Resim 4.10 Üç nükleuslu hücre	99
Resim 4.11 Dört nükleuslu hücre	100
Resim 4.12 Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre	100
Resim 4.13 İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre	102
Resim 4.14 Büyük bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre	102
Resim 4.15 Homolog kromozomlar arasındaki kromatid değişimi bulunan metafaz plağı.....	106
Resim 4.16 Kromatid kırığı bulunan metafaz plağı	106
Resim 4.17 Kromozom kırığı bulunan metafaz plağı.....	107
Resim 4.18 Fragment bulunan metafaz plağı	107
Resim 4.19 Disentrik kromozom bulunan metafaz plağı	108
Resim 4.20 Poliploidi bulunan metafaz plağı.....	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının genetik özellikleri.....	16
Çizelge 4.1 <i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile denenen pestisitlerin S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda plak inkorporasyon testi sonuçları.....	93
Çizelge 4.2 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve proliferasyon indeksi (Pİ) değerleri.....	96
Çizelge 4.3 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen MN, BNMN ve CBPI değerleri.....	101
Çizelge 4.4 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı, KA/ hücre ve Mİ değerleri	105
Çizelge 4.5 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve proliferasyon indeksi (Pİ) değerleri.....	111
Çizelge 4.6 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen MN, BNMN ve CBPI değerleri.....	113
Çizelge 4.7 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı, KA/ hücre ve Mİ değerleri	115

1. GİRİŞ

Son yıllarda insanlar, hızla gelişen teknoloji gereği, çok geniş spektrumlu birçok kimyasal madde çeşidine maruz kalmaktadır. Teknolojinin bizlere getirdiği kolaylıkların yanı sıra her yıl farklı alanlarda üretilen binlerce kimyasal madde piyasada yerini almakta ve insan sağlığını da doğrudan ya da dolaylı yollardan tehdit etmektedir. Çevrede yaygın olarak kullanılan bu kimyasal ürünlerden biri de pestisitlerdir.

Günümüzde tarımsal arazilerden yüksek verim elde edebilmek için kimyasal maddeler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Delen vd. 2005). Başta böcekler olmak üzere, hastalık etkenleri ve yabancı otlar ile mücadelede, kimyasal bileşiklerden sıklıkla faydalanılmaktadır. Pestisitler, amacına uygun olarak dikkatli ve uygun dozlarda kullanıldıklarında oldukça yararlıdırlar. Fakat gelişigüzel ve yüksek dozlarda kullanımı hem insan sağlığına zarar verebilir, hem de çevre kirliliğini arttırarak diğer canlıları olumsuz yönde etkileyebilir (Kocaman 2007). Gelişmekte olan ülkelerde, pestisit zehirlenmesinden kaynaklanan ölümler, enfeksiyon hastalıkları sebebiyle meydana gelen ölümlerden daha fazladır. Ayrıca, bu ülkelerde pestisitlerin kolaylıkla temin edilmesi, pestisit içerek intihar girişimini en popüler kendine zarar verme yöntemi haline getirmiştir (Eddleston *et al.* 2002). Bunun yanı sıra Garcia vd. (1998), pestisitlere maruz kalan ana-babaların çocuklarında, doğuştan gelen bozukluk (teratojenik etki) riskinin arttığını bildirmişlerdir.

Çevresel faktörlerin; kalıtsal doğum bozuklukları, kalp hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve gelişimsel doğum bozukluklarına neden olmalarının yanı sıra, kanserin temel nedeni olduklarına ilişkin hipotez, gün geçtikçe destek kazanmaktadır (Vural 1996). Dolayısıyla her yıl piyasaya sürülen bu sayısız kimyasal ürünlerin kullanılmadan önce, kanserojenik ve genotoksik potansiyel risklerinin test edilmesi, insan ve çevre sağlığı bakımından önem arz etmektedir. Bu nedenle araştırmacılar kanserojenite ve

genotoksisite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Bütün bu test yöntemleri kimyasal maddelerin mutajenik ve genotoksik aktivitelerinin belirlenebilmesi için birbirinden bağımsız olarak kullanılabileceğı gibi birkaçı bir araya getirilerek karşılaştırma da yapılabilir. Bir maddenin mutajenik ve genotoksik açıdan risk teşkil edip etmediğinin tespit edilmesi birkaç test tarafından taranarak yapılırsa daha güvenilir sonuçlar elde edilecektir.

Bu çalışmada, tarımda yaygın olarak kullanılan iki pestisit, farklı test sistemleri ile sitogenetik ve genotoksik etkileri hakkındaki bilgi eksikliği giderilmeye çalışılmıştır. Dolayısı ile bu maddelerin farklı test sistemlerinde, genetik aktivite profili ortaya çıkarılmış ve etkili konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Pestisitler

Tarım ürünlerine veya hayvansal gıdalara; üretim, hasat, depolama ve taşıma esnasında zarar veren herhangi bir zararlıyı kontrol etmek ya da bunların zararlarını önlemek üzere uygulanan veya hayvanların vücutlarında bulunan herhangi bir böcek ya da zararlıının kontrolü amacıyla hayvanlara verilen madde veya maddelere pestisit denilmektedir (Helvacı 2003).

Hastalık, zararlı ve yabancı otların tarımsal üretimde neden olduğu kayıp ortalama olarak %20-40 arasında değişmektedir. Bu kayıplar hasat, kurutma, depolama, işleme aşamalarında da devam etmektedir. Dünya hububat üretiminin yaklaşık %20'si hasat öncesi ve sonrası aşamalarda kaybolmaktadır. Pestisitler; hastalık, zararlı ve yabancı otların zararlarını azaltmaktadır, bunun sonucunda üretim artmakta, kalite yükselmekte, ekonomik geri dönüş gelişmektedir. Pestisit kullanımı 1940'lı yıllardan beri tarımsal üretimin artırılması, bitki hastalıkları ile savaş ve bunun yanı sıra istenmeyen bitki ve böceklerin ortadan kaldırılabilmesi için sıkça kullanılan en önemli bileşenlerden biridir (Int. Kyn.1)

Pestisitler çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olduklarından dolayı, oldukça fazla miktarda kullanılmaktadırlar. Kullanım sıklığına bağlı olarak yayılımları da geniş bir alana sahiptir. Pestisitler doğrudan ya da dolaylı olarak havaya, sulara, toprağa, yiyeceklerle karışmakta ve en son olarak insanlar üzerinde zararlı etkilere sebep olabilmektedirler. Pestisit uygulaması yapılmayan kutuplardaki penguenlerde, ayı balığı ve eskimolarda *p-p*-dikloro difenil trikloroetan (DDT)'ın varlığının saptanması, bazı tarım ilaçlarının dünyadaki sirkülasyonunun ne kadar güçlü olduğunu göstermesi

bakımından önemlidir (Int. Kyn. 2). Belirli bir bölgeye uygulanan pestisitler biyolojik ve fiziksel yollarla çevreye yayılarak, tüm canlıların çeşitli şekillerde bunlarla temasına yol açarlar. Böylece, pestisitler ve kalıntıları çok çeşitli yerlerde ve farklı zamanlarda biyolojik besin zincirine girerler (Asal 1983).

Pestisitler son zamanlarda insan sağlığı, çevre ve doğal dengeyi olumsuz yönde etkilemesi, ürünlerde, toprakta, suda ve havada kalıntı bırakması, hastalık, zararlı ve yabancı otlarda dayanıklılık meydana getirmesi gibi birçok istenmeyen etkilerinin olmasıyla sorgulanmaya başlanmıştır. Bunun sonucu olarak bir taraftan pestisitlerin bilinçli ve teknik tavsiyelere uygun olarak kullanılmasını sağlamak için gerekli tedbirler alınırken diğer taraftan 1980'li yıllardan itibaren kimyasal pestisit tüketiminin azaltılması için politika ve stratejiler oluşturulmuş ve eylem planları hazırlanmıştır (Helvacı 2003).

Kısa yaşam döngülü ve yıllık döl sayıları fazla olan zararlı türlerde, direnç probleminin ortaya çıkışı çok kısa sürede olmaktadır. Dirençli populasyonlar üreticilerin daha sık aralıklarla ve yüksek dozda ilaçlama yapmalarına neden olmaktadır. Bu davranış hem direnç probleminin artışına neden olurken, hem de çevrede kirliliğe neden olmaktadır. Aynı zamanda yoğun pestisit kullanımı kısa süre ekosistemdeki doğal baskı unsurlarını artırmakta ve bunun sonucu olarak o güne kadar populasyonları ekonomik olarak zarar oluşturamayan bazı zararlı organizmaların populasyon yoğunluklarının artışına neden olmaktadır (Int. Kyn. 3).

Pestisite dirençli hale gelme olgusunun biyolojik açıklaması, doğal seçim ve bireyler arası genetik farklılıklara dayanır. Bir böcek populasyonuna yeni bir pestisit uygulanınca populasyonun %99'a yakın kısmı ölür. Kalan %1, bireyler arası genetik farklılık sonucu pestisite direnci olan bireylerdir. Hayatta kalan birkaç dirençli birey ortamda hızla üreyerek kısa zamanda pestisite dirençli yeni bir populasyon oluşturur.

Dolayısıyla sürekli olarak yüksek dozlarda pestisit kullanmak pestisite dirençli popülasyonların doğal seçim ile ortaya çıkmalarına neden olmaktadır (Gedikli 2001).

2.2 Organik Fosforlu Pestisitlerin Üretimi ve Kullanımı

Pestisitler bütün dünya ülkeleri tarafından kullanılmakta olup kullanım sıklığı ve miktarı ülkede üretilen ürünler, iklim şartları, mevcut zararlılar ve ülkenin gelişme düzeyi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Organik fosforlu pestisitler en önemli pestisit sınıfını oluştururlar ve insektisit olarak kullanımlarının yanı sıra az da olsa herbisit olarak da kullanılırlar. En büyük kullanım alanları tarımdır. Halk sağlığının korunması amacıyla kullanımları da önemlidir. Bu bileşikler, ayrıca bahçe ve sera bitkilerinde kullanılmak için serbestçe piyasada satılmakta, böylece çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Malley 1997). Piyasada 200'den fazla farklı organik fosforlu insektisit etkili aktif madde bulunmaktadır. İlk organik fosforlu insektisitler, 1937'de Almanya'da Schrader önderliğinde bir grup kimyager tarafından sentezlenmiştir. Bu sentezlenen ve deneme ürünlerinin son derece toksik olduğu gösterilmiş ve İkinci Dünya Savaşı'nda nazilerin kontrolünde tutulmuştur. Bunların bir kısmı kimyasal savaş silahı olarak geliştirilmiştir. Bunlardan Tabun ve Sarin'in sentezi sır olarak saklanmıştır. Sinir gazı ismi verilen bu tip organik fosforlu bileşiklerin memelilere toksik olduğu gibi, insektisit özelliği de olduğu anlaşılmış ve bu amaçla Tetraetil pirofosfat (TEPP) sentezlenmiştir. 1944 yılında Schrader, daha dayanıklı bir bileşik olan Paration ve oksijen analogu Paraokson'u sentez etmiştir. Bu yıldan sonra da organik fosfor yapısındaki insektisitlerin üretimi ve kullanımı artmıştır. Ancak 1950'li yıllardan sonra DDT'nin yerini Paration'un alması ile birçok fetal ve akut zehirlenme olayları bildirilmiştir (Vural 1996).

2.2.1 Organik Fosforlu Pestisitlerin Etki Mekanizması

Organik fosforlu pestisitler biyolojik etkilerini, enzim inhibitörü olarak gösterirler. Esterazlar böcek ve memeli türlerindeki organik fosforlu toksisitesi için hedef enzimlerdir.

Sinir sisteminin çalışması ile yakından ilişkisi olan en önemli enzim; kolinesterazdır. Kolinesteraz iki gruba ayrılır. Eritrositlerde bulunan kolinesteraza asetilkolinesteraz, serumda bulunanlara ise psödokolinesteraz adı verilmiştir. Toksik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olan asetilkolinesteraz (AChE)'i inhibe etmeleri, biyotransformasyonları ile çok yakından ilgilidir. Bütün tiyofosforik asit esterleri *in vivo* olarak “okson” metabolitlerine dönüşürler. P=S bağı içeren organik fosforlu insektisitler, aktif kolinesteraz inhibitörleri değildirler. Aktivasyon için P=S'nin P=O grubuna oksidasyonları gerekmektedir (Marrs 1993, Vural 1996, Klassen *et al.* 2001).

Buna göre organik fosfatlı insektisitler iki tiptir:

1. Doğrudan etkili olanlar: Metabolik aktivasyon gereksiz kolinesteraz inhibitörüdürler. Sinir gazlarından Tabun, Sarin; insektisitlerden TEPP ve Dikloro divinil fosfat (DDVP), P=O yapısında olduklarından kolinesterazı doğrudan inhibe ederler.

2. Dolaylı etkili olanlar: Fosforiyat yapısındadırlar ve “okso” şekline dönüştükten sonra aktivite kazanırlar. Örneğin, Malathion Malaokson'a, Parathion Paraokson'a metabolize olduktan sonra AChE'yi inhibe ederler.

Organik fosforlu pestisitler vücuda girip emildikten sonra, santral sinir sisteminde ve eritrositlerde bulunan AchE ve plazmada bulunan butirilkolinesteraz enzimlerinin aktif bölgesinde fosfat radikallerine kovalent olarak bağlanarak bu enzimleri geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler (Besser and Gumann 1994, Marques *et al.* 1999, Tuncok ve Aksay Hoccoğlu 2006). Bu enzimlerin inhibisyonu sonucunda, hidrolize olmayan ve biriken asetilkolin önceleri merkezi sinir sisteminde kolinerjik sinaptik iletimini, somatik sinirleri, otonomik gangliyonları, parasempatik sinir uçlarını ve bazı sempatik sinir uçlarını uyarır ve daha sonra felce yol açar (Dağlıoğlu 2004, Tuncok ve Aksay Hoccoğlu 2006).

Organik fosforlu insektisitlerin AchE'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe etmeleri, aynen doğal substrat (asetilkolin) gibi enzimin esteratik merkezinde serin molekülüne bağlanmaları ve böylece enzimin aktif merkezini bloke etmeleri şeklindedir. Normal substrat ve inhibitörün enzime yaklaşp bağlanmaları ve hidroliz ile ayrılmaları benzer hızdadır. Fakat normal substrat ile reaksiyonda enzimin rejenerasyonu ne kadar çabuk ise fosforilasyona uğramış enzimin hidrolizi de o kadar yavaştır (10 gün). Bundan dolayı AchE aktivitesi ancak karaciğerde yeni enzim yapımından sonra normal düzeyine yükselir. Bu da zehirlenmenin şiddetine göre 5 haftaya kadar uzayabilir (IARC 1991).

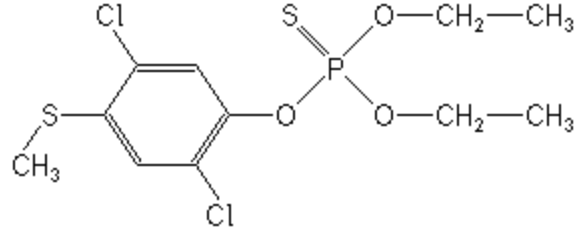
Ayrıca organik fosforlu pestisitler aynı zamanda alkilleyici ajanlardır (Bedford and Robinson 1972, Woode and Wright 1981). Alkilleyici ajanlar, oksitleyici özelliğe sahip bileşiklerdir. Bu tür elektrofilik moleküller hücre membranındaki lipitleri, hücrenin büyük ve önemli fonksiyonel molekülleri olan proteinleri ve deoksiribonükleik asit (DNA)'i oksitleyebilmektedirler. Membran lipitlerinin oksidasyonu membrandaki lipitlerin peroksidasyonuna neden olup hücre membran permeabilitesini bozarak hücre metabolizmasını ve morfolojisini bozmaktadır (Ames *et al.* 1993).

Organik fosforlu pestisitler, tüm membranlardan kolaylıkla emilirler. Deri, konjunktiva, akciğer ve özellikle de oral yoldan alındıklarında hızla absorbe olurlar. Toksisitenin şiddeti, AchE'nin inhibisyon derecesine bağlıdır (Klassen *et al.* 2001). Kolayca ulaşılabilirliği nedeniyle organik fosforlu pestisitler intihar amaçlı olarak sık kullanılmaktadır. Oral yoldan alındıklarında ciddi intoksikasyonlara yol açtığı gibi, deriden, mukozal membranlardan, konjunktivadan ve solunum yollarından da absorbe edilerek değişen derecelerde intoksikasyonlara neden olabilirler (Dharmani and Jaga 2005).

2.3 Çalışmada Kullanılan Organik Fosforlu Pestisitler

2.3.1 Chlorthiophos

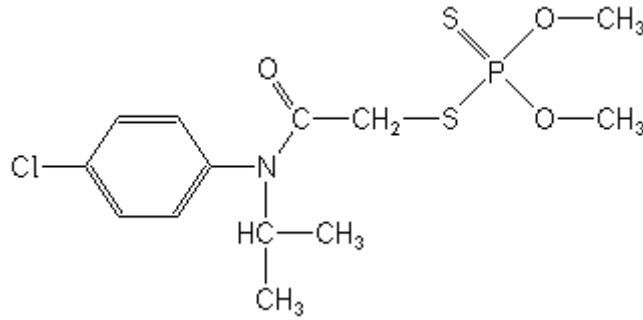
Chlorthiophos, organik fosforlu insektisit grubuna giren kristal şeklinde kahverengi bir madde olup soluma, yeme ya da deri teması ile vücuda nüfuz edebilir (Int. Kyn. 4). Etkisini; baş ağrısı, baş dönmesi, görmede bulanıklık, agresiflik, mide bulantısı, kaslarda kramp, ishal, bitkinlik ve göğüs bölgesinde rahatsızlık şeklinde hemen göstermeye başlar. Bunun yanı sıra iştahsızlık, uyku bozukluğu, hafızada zayıflama, fiziksel bozulmalar ve ellerde titreme gibi ileri derecede rahatsızlıklar da görülebilir (Hayes and Laws 1991). İnsektisit olarak kullanımının dışında çok nadir olarak akarisit olarak da kullanılmaktadır. Diğer organik fosforlu pestisitler gibi Chlorthiophos da etkisini AchE'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek gösterir. Chlorthiophos'un yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Organik fosforlu insektisit olan Chlorthiophos'un yapısal şekli

2.3.2 Anilofos

AchE inhibitörü olan Anilofos yaygın kullanılan önemli bir organik fosforlu herbisittir. Bu kimyasal madde genellikle pirinç tarlalarında yabancı otların kontrolünü sağlamak amacıyla geniş çaplı olarak kullanılmaktadır. Bu madde mukozal membran tarafından kolayca absorbe edilerek sindirim sistemi ve solunum sistemi aracılığı ile kan ve diğer vücut dokularına yayılabilir. Anilofos'un yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Organik fosforlu herbisit olan Anilofos'un yapısal şekli

2.4 Mutajenite Test Sistemleri

İnsanlar günlük yaşamlarında veya çalışma ortamlarında genotoksik maddelerin mutajenik ve kanserojenik etkisi ile karşılaşmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile birlikte üretilen yeni kimyasallar, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları ve çevreye verilen atıklar canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma ihtimalini arttırmaktadır.

Bazı kimyasal maddelerin insanlarda kansere neden olduğu uzun yıllardan beri bilinen bir gerçektir. Çevrede her yıl farmakolojik ürünler, gıda ve ev ürünleri, pestisitler ve petrol ürünleri gibi binlerce yeni kimyasal madde üretilmektedir. Buna ek olarak mutajenite ya da kanserojenitesi bilinen birçok bileşikte doğada kendiliğinden meydana gelmektedir (yiyeceklerdeki mikotoksinler gibi). Dolayısıyla insanların zorunlu olarak (tıbbi ilaçlar gibi), günlük yaşamlarında kullandığı (ev ürünleri, kozmetik ürünleri gibi) veya farkında olmadan (pestisitler gibi) maruz kaldıkları bu gibi kimyasal maddelerin kansere ya da genetik hasara neden olup olmadığının araştırılması gerekmektedir (Int. Kyn. 5). Bu nedenle; günümüzde mutajenik, genotoksik, kanserojenik, antimutajenik ve antikanserojenik maddelerin etkilerinin araştırılması oldukça önemli hale gelmiştir (Stich and Dunn 1986).

Sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi, sağlığımız açısından gerekli olmakla birlikte, laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserojenez deneyleri hem çok zaman almaları, hem de çok pahalı olmaları nedeniyle tercih edilmemektedir (Maron and Ames 1983, Debnath *et al.* 1991).

Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvana maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir (Bağcı 1985,

Forman and Ames 1991). Ayrıca hayvan deneylerinde cinsiyet faktörü, yaş, veriliş biçimi ve tür farklılığı, farklı sonuçlara neden olmasından dolayı sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir.

Canlı hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. “Kısa zamanlı testler” diye bilinen bu testlerle, kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985). Kısa dönemli *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin bakterilerde mutajenik etkisinin hücrelerde değişmeye neden olup olmadığı, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisi, memelilerde ise mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar (Vural 1984). Ayrıca bakteriyel testlerin yanı sıra, periferik kanda uygulanan sitogenetik yöntemlerde, kimyasal maddelerin genotoksik açıdan risk oluşturup oluşturmadığını belirlemek için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

In vitro testlerin avantajları, çok sayıda kimyasal maddeyi hızlı bir şekilde değerlendirme imkânı vermesi, mutajenite ve kanserojenitenin mekanizmasını önermesi, hayvansal test sistemlerinin azalması, insan ve hayvan risk tayinine katkı sağlaması olarak sayılabilir (Barile 2008).

2.4.1 Bakteriyel Yöntemler

Kimyasal maddelerin, kullanılan yiyeceklerin ve gıda katkı maddelerinin oluşturduğu, mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde bakterilerin kullanımı, tüm canlıların ortak genetik materyali olan DNA’nın primer yapısının incelenmesi temeline dayanmaktadır. DNA çok farklı bölgelerde ve çeşitli mekanizmalarla hasara

uğrayabildiği için hasarın direkt olarak gösterilmesi teknik olarak zordur. Diğer yandan, bakterilerin mutasyon çalışmalarında kullanılması, DNA hasarının dolaylı olarak saptanabilmesinde oldukça hassas bir indikatördür. Fiziksel ya da kimyasal maddelerin DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanmaktadır (Gatehouse *et al.* 1990). Bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (Bağcı 1985).

Bakteriyel test sistemleri genellikle dünyanın birçok laboratuvarında güvenle uygulanabilen, mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen testlerdir (Purchase *et al.* 1978, McMahon *et al.* 1979, De Serres and Ashby 1981). Bu testlerin tercih edilme nedenleri, bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı bir şekilde üreyebilmeleri, ayrıca basit, ucuz ve çabuk uygulanabilir olmalarıdır (Josephy *et al.* 1997). DNA'nın kompleks bir yapıya sahip olduğu yüksek yapıli organizmaların aksine bakteriler, hücre duvarından kimyasalların kolayca geçişini sağlayan tek zincirli ve halka şeklinde bir DNA molekülüne sahiptirler. Bakteriler tek bir testle milyonlarca hücreye sahip bir popülasyonun incelenmesine olanak sağlamasından dolayı oldukça avantajlıdır (Int. Kyn. 5).

Bakterilerin mutajenik aktivitenin belirlenmesinde kullanılmasının birçok avantajı vardır. Ancak bu deneylerde kullanılan birçok bakteri, memelilerde birçok kimyasalın transformasyonunu sağlayan enzim sistemlerine sahip değildir (Miller and Miller 1966). Bu problemi ortadan kaldırmak için ise laboratuvarlarda bu enzimleri içeren özel enzim ekstraktları oluşturulmuştur. Bu enzim sistemleri ise sitokrom bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidazları, esterazları, glutatyon S-transferazları, sülfotransferazları, açıl ve metil transferazları, dehidrojenaz ve peroksidazları içermektedir (Gatehouse *et al.* 1990). Bakteriyel test sistemleri arasında en yaygın kullanılanları Ames testi ve Umu (SOS) test sistemidir.

UMU (SOS) Test Sistemi

SOS test sistemi, kimyasal maddelerin genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir (Quillardet and Hofnung 1985). SOS-cevabı esas alınarak geliştirilmiştir ve regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmış sistemdir (Oda *et al.* 1985, Walker 1985). SOS test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutajenez ile ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır (Oda *et al.* 1985).

Bu test sisteminde kullanılan *E.coli* ve *Salmonella typhimurium* suşları, β -galaktosidaz aktivitesi için hibrit bir protein oluşturan *umuC'*-*lacZ* füzyonuna sahip pSK1002 plazmidini taşır. SOS test sisteminde kullanılan atasal suşu oluşturmak için bu plazmid, kesip-çıkarma onarım mekanizması hatalı (*uvrB* mutasyonu), birçok kimyasal için daha kolay geçirgenliğe sahip (*rfa* mutasyonu) ve laktoz operonunda doğal bir delesyon gibi üstün özellikleri olan *S. typhimurium* TA1535 içine yerleştirilmiştir. Bu özellikler sayesinde testin duyarlılığı arttırılmış ve SOS testi için atasal suş olan *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 suşu oluşturulmuştur (Nakamura *et al.* 1987, Oda *et al.* 1992). Testlerde en yaygın olarak kullanılan suş, *E. coli* suşu ile K12 PQ37 olmuştur (Raabe *et al.* 1993).

Ames Testi

Kısa zamanlı bakteriyel testler içerisinde en yaygın kullanılanı, 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından (Ames 1979, Ames and McCann 1981, Maron and Ames 1983) geliştirilen Ames testidir. Bu test sistemi kimyasal

maddelerin mutajenik etkilerini araştırmak amacıyla standardize edilmiş ve günümüzde en fazla kabul gören yöntemlerden biridir (Maron and Ames 1983, Friedberg *et al.* 1995, Mortelmans and Zeiger 2000). Bu sistem; sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda *in vitro* mutasyonlar ile elde edilen histidin sentezini yapamayan bir dizi *Salmonella* mutant suşları kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Jorgensen *et al.* 1987, Mortelmans and Zeiger 2000).

Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *S. typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (his⁻) olan suşlarının test bileşeni uygulamasından sonra tekrar bir mutasyon geçirip his⁺ haline dönüşmesi esasına dayanmaktadır (Ames *et al.* 1973a). Histidin bulunmayan ortamlarda bu bakterilerin üremesi, dolayısı ile de koloni oluşumu gerçekleşemez. Histidin genindeki mutasyon bölgesinde veya bu genin yakınındaki bir bölgede oluşan yeni bir mutasyonla bu genin fonksiyonu düzeltilebilir ve hücreler histidin olmayan ortamda üreyebilirler. Bu nedenle, bu test sıklıkla bir “reversiyon (geri dönüşüm) yöntemi” olarak bilinmektedir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Ames testi başlıca iki varsayıma dayanmaktadır. Bunlardan birincisi, kullanılan maddelerin bakteri DNA'sı ile etkileşime girerek mutasyona ve insan dâhil diğer canlı türlerinde de benzer mutasyonlara yol a maya neden olmalarıdır. ikincisi ise, mutajenite ile kanserojenite arasındaki korelasyonun yüksek olmasıdır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Ames testinde, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenitesinin belirlenebilmesi için histidine ihtiyaç duyan suşlar kullanılmaktadır. Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA98 ve TA100 suşları genel bir kabul görmüştür (Gatehouse *et al.* 1990). Bunların dışında en çok kullanılan test suşları ise

TA97, TA102, TA1535 ve TA1538'dir. Bu test suşlarının her biri histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983). Ames testinde kullanılan suşlar ve onların genetik özellikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının genetik özellikleri (Öksüzoğlu 1997)

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenecek Bileşik Sınıfları
TA1535	his G 46	Rfa	$\Delta uvrB$	-	AT→GC transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA1537	his C 3076	Rfa	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA1538	his D 3052	Rfa	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA98	his D 3052	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA100	his G 46	Rfa	$\Delta uvrB$	+	AT→CG transisyon	Baz çifti değişimine neden olan mutajenler
TA97	his D 6610	Rfa	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler
TA102	PAQ1 his G 428 Δ his	Rfa	$\Delta uvrB$	-	G Ochre AT	Oksidantlar, X-Işınları, U.V mitomycin C, bleomisin, H ₂ O ₂ ve kinonlar...

LPS: Lipopolisakkarit

Test bakterileri nokta ve çerçeve kayması mutasyonunun yanı sıra, lipopolisakkarit duvar yapımındaki genlerde de mutasyon içermektedir. Bakteriler ayrıca mutant genler taşıyan plazmitlere sahiptir. Plazmitlerin taşıdığı genler error-prone (hataya açık onarım) SOS onarım enzimlerini yabani tipten daha etkili şekilde üretmektedir. Bu mekanizma mutasyona çok açık olduğu için mutant suşlarındaki DNA hasarının pek çok çeşidi onarılacak yerine mutasyona dönüştürülür (Russell 1998).

Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikler de DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta kanserojenik forma dönüştürmektedir (Haack *et al.* 2001). Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir maddenin, bu enzim aktivasyonunun etkisi ile nasıl bir potansiyele sahip olacağının belirlenmesi kaçınılmazdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilebilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstraktı bakteriyel sisteme dâhil edilerek testler aynı prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan enzim preparatı, sıçanların, enzim aktivasyonu uyarılmış olan karaciğer dokularından homojenize edilen post-mitokondriyal süpernatantdır (Hass *et al.* 1986). Bu materyal, ilaç metabolize edici enzimlerin bir çeşidini, sitokrom-bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidaz, esterase, glutatyon S-transferaz, sülfotransferaz, açıl transferaz, metil transferaz, dehidrojenaz, esterase ve peroksidazları içermektedir. Enzim özütü, kofaktörler, tuzlar ve tampon sistemle tamamlandığında S9 fraksiyonu adını almaktadır (Gatehouse *et al.* 1990).

Reversiyon test yöntemi uygulamalarında, farklı özelliklerde geliştirilen ve çeşitli amaçlarla kullanılan *S. typhimurium* test suşları dışında *E. coli*'nin bazı suşları da yer almaktadır. Bu bakteri kültürleri de aynı prensibe uygun olarak, triptofan E lokusunda oluşturulan mutasyonla oksotrof hale getirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ve *E. coli* WP2 (pKM101) suşları AT baz çifti mutasyonu taşımaktadır (Gatehouse *et al.* 1990).

Ames yönteminde, pozitif sonuç veren bir madde, insan ya da diğer memeliler de kesinlikle mutajenik veya kanserojeniktir anlamına gelmez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, maddenin potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca bu test sistemi, yüksek organizmalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir göstergedir (Eren 2011).

S. typhimurium LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş suşların genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Histidin mutasyonu: Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan baz ilavesi veya çıkarması ile mutant hale getirilmiştir.

His G 46 mutasyonu: His G geni bakteriler tarafından histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlayan gendir. Bu mutasyon TA1535 ve TA100 mutantlarında vardır. His G geninde lösin amino asidinin kodonu -GAG- baz çifti değişimi sonucu prolin amino asidi kodonu olan -GGG- dönüşmüştür. Bu mutasyon her iki mutantda da baz çifti değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülür.

His D 3052 mutasyonu: His D geni de histidin sentezinde kullanılan histidinol dehidrojenaz enzimini kodlamaktadır. Bu mutasyon gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. TA98 ve TA1538 mutantlarında vardır.

His D 6610 mutasyonu: Bu mutasyon gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır.

His G 428 mutasyonu: “ochre” stop kodonu varlığından dolayı His G geni inaktif durumdadır.

Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığını arttırmak için bu suşlara aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir.

UvrB mutasyonu: Bu mutasyon DNA onarım sisteminde kesip-çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan UvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Delesyon sonucu “chl” ve “bio” genleri de çıkarılmıştır. “Bio” geni bakterinin biotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bakteriler üreyebilmeleri için histidin aminoasidine olduğu gibi biyotin aminoasidine de ihtiyaç duyarlar.

R faktörü: Ampisilinin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçlarının artmasına, gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktör genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir (Nakamura *et al.* 1992, Cerna *et al.* 1998, Durusoy and Kambur 2003).

2.4.2 Sitogenetik Yöntemler

Mutajen ve kanserojen maddelerin önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmeleridir. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespiti mümkün değildir. Kimyasal yöntemlerle bu maddelerin tespit edilmesi mümkün olmadığı için, biyolojik yöntem ve indikatör canlı dokularında kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır (Türkez 2007).

Metabolizma ürünleri mutajen ve kanserojen olabileceğinden, ayrıca çeşitli örneklerde biyotransformasyonları farklı olduğundan inhalasyon maddeleri veya diğer potansiyel mutajenik maddeler için kullanılacak testler insan hücrelerinin analizi şeklinde olmalıdır (Baden and Simmon 1980).

Biyozileme çalışmalarında giderek artan şekilde sitolojik yöntemler kullanılmaktadır. İnsan çalışmalarında sitogenetik olarak geline son aşamalardan biri de insan lenfositlerinin incelenmesidir (Tucker and Preston 1996). Sitogenetik çalışmalar, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli popülasyonlar için (Barquinero 1993) ya da bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilmektedir (Fender and Wolf 1998).

Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, KA, KKD ve MN testleridir (Albertini *et al.* 2000). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında (Topaktaş *et al.* 1996, Desesso *et al.* 2000), *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde (Surrallés *et al.* 1996) uygulanabilmektedir. Çoğunlukla da, farklı tipteki genetik hasarların gösterilmesinde sıklıkla tercih edilen, kısa zamanlı lenfosit kültüründe

gerçekleştirilmektedir (Cebulska-Wasilewska *et al.* 1999, Fenech *et al.* 1999, Roy *et al.* 2000). Bunların yanı sıra comet testi ve hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HPRT) mutasyon testi de sıklıkla kullanılan sitogenetik yöntemlerdendir.

Kromozom Aberasyon Testi

Kromozomlar, hücrenin çekirdeğinde bulunan, DNA ve proteinden oluşmuş sayısı ve şekli her canlı için sabit olan, hücre bölünmesi sırasında iğ iplikleri halinde ortaya çıkan ve renkli boyalarla boyanan yapılardır. Kromozomlar üzerinde genler dizilidir. Her kromozom çok uzun büyük moleküllü ve molekülle birlikte proteinlerin çok sayıda sarmallar meydana getirmesiyle hücre bölünmesinin metafaz safhasında gözlenebilir duruma gelir. İnterfazda sarmalların kısmen veya tamamen çözülmesi nedeniyle kromozomlar ayırt edilemezler (Ateş 2002, Bahçeci 2002).

İnsan ya da diğer canlıların kromozomlarını incelemek için ilk koşul hücrenin bölünme döneminde olmasıdır. Bu özellikteki hücreler yani bölünme durumundaki hücreler çeşitli yöntemlerle elde edilir. Çalışmalarda herhangi bir dış uyarana gerek kalmadan vücutta sürekli bölünen hücreler kullanılır. Diğer yöntemde ise vücuttan alınan hücreler yapay uyarıcılarla mitoz bölünmeye sokularak kullanılabilir. Kromozom çalışmaları için, bölünmenin çok olduğu soğan ya da bitkilerin kök ucu hücreleri gibi materyaller kullanılmaktadır (Kurtulmuş ve Aydın 2007).

Çeşitli dokularda kromozomlar, mitoz bölünmenin metafazında en iyi şekilde görülebilir. Çünkü kromozomlar, mitozun metafazında en kısalmış ve kalınlaşmış haldedir. Kromozom incelemelerinin yapılabilmesi için çok sayıda metafazda hücre bulunmalıdır. Oysa bu çalışma için en fazla kullanılan materyallerden birisi olan insan periferik kan lenfositleri düşük bir oranda kendiliğinden bölünmeye girerler. Bu yüzden

fitohemaglutinin denilen madde ile hücre kültürlerinde lenfositler yapay olarak mitoz sokulurlar. İşlem bununla bitmez mitoz bölünmenin metafaz evresine girmiş olan hücre belli bir süre sonra anafaz evresine geçecektir ve bu çalışmalarda istenilen, hücrenin metafaz evresinde kalmasıdır. Bu amaçla yani, mitoz bölünme durumunda olan hücrelerin metafazda birikmesi için hücrede iğ ipliklerinin parçalanmasını sağlayan bir madde (örneğin, kolşisin) kullanılır. Mitoz bölünme sırasında kromozomlar sayılarının çokluğu ve hücrelerin küçüklüğü nedeniyle oldukça sıkışık durumdadır. Hücre içindeki kromozomları daha iyi görülebilir duruma getirebilmek için kromozomların daha büyük bir düzlem içinde dağılmaları sağlanmaktadır. Bu işlemlerden sonra kromozom preparatları hazırlanır, DNA boyalarından biriyle boyanarak gerekli incelemeler yapılabilir ve kromozom fotoğrafları çekilebilir (Rencüzoğulları ve Topaktaş 1991).

Kromozom aberasyon yöntemi oldukça yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olup bu testte kültüre alınmış periferik lenfositlerindeki kromozom anormallikleri incelenmektedir. Yapısal ve sayısal değişimler, kromozomal anormallik tekniği kullanılarak mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir (Çakmak 2000).

Kromozom aberasyonlarının çeşitli etkenlere (kimyasallara, iyonize ve iyonize olmayan radyasyona vb.) maruz kalma sonucunda oluştuğu pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur. Nitekim tümör hücreleri üzerinde yapılan detaylı araştırmalar bu hücrelerin yapısal ve sayısal kromozom değişiklikleri içerdiğini göstermiştir (Demiroğlu 2003, Sugai *et al.* 2005).

Kromozomlar, hücrenin hayat döngüsündeki sentez fazı (S fazı) sırasında replike olurlar. Replikasyon sırasında tüm DNA molekülleri açılmaktadır. Bu DNA molekülleri, metafaz kromozomları veya interfaz kromatinin fibrilli yapısı ile karşılaştırıldığında çok büyüktürler. Örneğin, Du Praw (1970)'ın yaptığı hesaplamalara göre insanın 1. kromozomu 7,5 cm uzunluğunda DNA molekülü içerir. Bu DNA

molekölü interfazda 1350 µm fibriller yapısına paketlenir ve metafazda yaklaşık 10 µm uzunluğundadır. Dolayısı ile DNA molekülleri, hem interfaz hem de S evrelerinde çok büyük boyutları nedeni ile mutasyonlara neden olan fiziksel ve kimyasal maddelerin açık hedefleridir. Oluşacak olan DNA hasarı sonucunda mikroskopta görülebilen yapısal KA'ları oluşur (Obe *et al.* 2002).

İndüklenmiş kromozomal aberasyonlar; kromozom-tipi aberasyonlar (simetrik aberasyonlar) ve kromatid-tipi aberasyonlar (asimetrik aberasyonlar) olmak üzere iki ana grupta değerlendirilmektedir. Eğer aberasyon tek bir kromatidde görülüyorsa buna kromatid tip, her iki kromatidinde de görülüyorsa kromozom tip aberasyon denir. Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenik maddenin tipine bağlıdır. İyonize ışınlar gibi ajanlar, hücre G1 safhasında iken etki ederse kromozom tip aberasyonlar, eğer hücre G2 safhasında iken etki ederse kromatid tip aberasyonlar, S safhasında iken etki ederse her 2 tip aberasyonlar meydana gelebilir (Natarajan and Obe 1982). Bu durum, kimyasal mutajenlerin daha çok hücre siklusunun S safhasında etkili olduklarını düşündürmektedir (Adler 1984). Tüm kromatid tipi ve kromozom tipi aberasyonlar, kanser riski açısından ön göstergedir. Buna göre; kromozom hasarı oluşumunun farklı dokularda benzer olduğu farz edildiğinde, lenfositlerdeki hasar miktarının, kanser risk seviyesini yansıtmaları beklenir (Norppa *et al.* 2006).

KA testleri ile bunların dışında fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozomlar ve endoreduplikasyon gibi yapısal kromozom aberasyonları da tespit edilmektedir. Bazı araştırmacılar tarafından KA olarak kabul edilmeyen ancak yine de bir anormallik sonucu oluşan yapısal bozukluklar ise gap, spiral çözülmesi ve kromozom kontraksiyonudur.

a) Kromatid kırığı: Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılma olur ve anafazda kromatidlerin kutuplara çekilmesi sonucu hücrelerden biri eksik kromozom bulundurur.

b) Kromozom kırığı: Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada kırılma olur. Bu durumda hücrelerin her ikisi de eksik kromozom bulundurur.

c) Fragment: Kopmuş olan kromozom parçalarıdır. Metafaz plağında kopmuş olduğu kromozomdan ayrı yerlerde bulunurlar.

d) Disentrik kromozom: Kromozom kırığı meydana geldiği zaman, sentromer içeren parçanın kopuk uçlarının birleşmesi sonucu disentrik kromozomlar oluşur.

e) Kardeş kromatidlerin birleşmesi: Kromozom kırıklarının olduğu durumlarda yaralı kardeş kromatidlerin kırık olan uçlarının birleşmesidir. Mitozun anafazında bu kromatidler zıt kutuplara çekilirken kromozom köprüsü oluştururlar.

f) Halka kromozomu: Bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan yaralı uçların birleşmesi ile halka (ring) kromozomlar oluşur. Bu kromozomların kardeş kromatidlerinin zıt kutuplara çekilmesi sonucu her bir hücrede bir halka kromozomu bulunur.

g) Translokasyon: Kromozomal bir kopmada kopuk olan bir uca homolog olmayan kromozomlardan başka bir kopuk parçanın yapışmasıdır. Translokasyona neden olan kromozom parçası yer değişimleri, tek taraflı veya karşılıklı olabilir.

h) İnversiyon: Bir kromozomun içinden kopan parçanın ters dönerek aynı yere yapışmasıdır. İnversiyon sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişme meydana gelir.

ı) İzokromozom: Primer boğumda oluşan kromozomal bir kopma sonucu, kardeş kromatidlerin birleşmesidir. Böylece her iki kolu da birbirinin aynısı olan kromozomlar meydana gelir.

i) Kromozomun kopup enine olarak ters dönmesi: Krossing-over'e benzer bir olaydır. Bu durum homolog olmayan parçalar arasında gerçekleşirse kromozomal yapıyı değiştirir.

j) Endoreduplikasyon: Bazı durumlarda bölünmeyen hücrelerin DNA'sı tekrar replike olur. Bunun sonucunda önceki kromozomun her bir kromatidinden iki kromatidli birer kromozom meydana gelir. Fakat bu kromozomlar birbirinden ayrılmayıp bir arada kalırlar. Metafaz plağında ise bunların iki kromozom ve dört kromatitden oluşmuş yapılar şeklinde görülmelerine endoreduplikasyon adı verilir (Topaktaş ve Rencüzoğulları 1995, Solak 2000).

Kardeş Kromatid Değişimi

KKD testi, çevredeki atıkların etkisini araştırmak için 1957 yılında Taylor vd. (1957) tarafından geliştirilmiş olup, kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri arasında en hassas ve en fazla kabul edilen yöntem haline gelmiştir.

KKD analizi, genotoksik maddelerin DNA'da oluşturduğu hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan doğrudan metodlardan birisidir. KKD kromozom morfolojisi değişmeksizin, kardeş kromatidler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişi sonucu kromatidlerin karşılıklı farklı boyanması olarak tanımlanmaktadır (Taylor *et al.* 1957, Sinyth and Evans 1976, Painter 1980, Sharma and Das 1981, Shafer 1982, Carrano and Natarajan 1988, González Borroto *et al.* 2002, Eisha *et al.* 2004).

Çeşitli mutajen ve kanserojenlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullar altında neden olduğu DNA hasarını saptamayı sağlayan hızlı, duyarlı ve kantitatif bir ölçüm metodudur. Doku tipine, kimyasal maddenin doz oranına ya da diğer faktörlere göre farklılık gösteren KKD, DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas göstergesi olarak kabul edilir (Wolff 1980, Cleaver *et al.* 1996, Koşar Aslan 1999, Stoilov *et al.* 2002, Helleday 2003).

Çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle kromozom DNA'sında meydana gelen ve replikasyon esnasında onarılmayan hatalar KKD'nin ortaya çıkmasını ya da artmasını sağlar. KKD analiz yöntemi ile bir maddenin çok düşük konsantrasyonlarda bile olası mutajenik özelliği kromozom düzeyinde gösterilebilmektedir (González Borroto *et al.* 2002, Soyöz ve Özçelik 2003). Yani DNA hasarına neden olan pek çok kimyasal maddenin KKD sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle pek çok mutajenik ya da

kanserojenik etkileri olan maddelerin genotoksik aktivitelerini göstermede duyarlı bir parametre olarak kabul edilir (Büssing *et al.* 1994). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır (Perry and Evans 1975, Carrano *et al.* 1978, Albertini *et al.* 2000). Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng vd. (1978) tarafından bildirilmiştir.

KKD'de, kardeş kromatidler arasında gözlenen değişim noktalarının, replikasyon çataları olduğu düşünülmektedir. Çünkü replikasyon çatalında homolog çift sarmallar birbirine çok yakındır ve homolog birleşmeler çok kolaylıkla meydana gelebilir (Park *et al.* 1999). Diğer bazı çalışmalar, bu noktaların aktif olarak transkribe olan genlerle ilişkisi olduğunu göstermektedir (Deliorman *et al.* 2000).

Mutajen ve kanserojen madde aktivitesinin ve kromozomlara olan etkilerinin belirlenmesinde, bazı kalıtsal hastalıkların teşhisinde çok duyarlı olan KKD testi birçok ökaryotik hücrede kullanılmaktadır. KKD, hem laboratuvar hayvanlarında hem de insan popülasyonlarında çalışılabilir (Taylor *et al.* 1957, Tucker *et al.* 1993).

KKD analizi, kültürde replikasyon yapabilen, filogenetik spektrumu *Drosophyla*'dan insana kadar uzanan her hücre hattında yapılabilir. Çin hamster fibroblast hatları, HeLa gibi insan hücre hatları, deri veya akciğerden alınmış insan hücreleri, fare, sıçan ve tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının ve insanların lenfosit kültürleri yaygın olarak çalışılmaktadır. Bitki, böcek, balık ve memelilere kadar *in vivo* KKD indüklemesi hem fiziksel hem de kimyasal maddelerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında insan ve fare amniyon sıvılarında da çalışılmaktadır (Tucker *et al.* 1993).

Günümüzde KKD'nin incelenmesi için en fazla tercih edilen hücreler lenfositlerdir. Çünkü lenfositler kolayca elde edilebilir, spontan kromozom hatalarını son derece az içerir. Bundan dolayı, KKD lenfositlerde başarıyla uygulanabilmektedir (Tanrıverdi 1991, Pitaque *et. al.* 1997, Landi *et al.* 1999).

KA'nın aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa *et al.* 2006). Klasik KA sayımına göre KKD sayımı tercih edilir. Çünkü KKD sayımı, KA sayımına göre daha kolaydır. Ayrıca KA sayımı, farklı sınıflardaki aberasyonları tanımada deneyim gerektirir ve en az 100 metafaz hücresinin sayılması gerekir. Ancak KKD belirlemede 20-25 hücre yeterli olmaktadır. Diğer taraftan şu açıktır ki bir kimyasalın mutajenitesini test etmek için KKD sayımı, KA sayımının yerini tutamaz. Direkt DNA iplik kırıklarını indükleyen ajanlar (iyonize radyasyon, bleomisin ve streptonygrin gibi) KA'yı indükledikleri oranda KKD frekansını arttırmazlar. Bu nedenle sitogenetik çalışmalarda hem KA hem de KKD'lere bakılması, o maddenin etkinliğinin anlaşılması açısından önemlidir (Natarajan and Obe 1982).

Kardeş Kromatid Değişiminin Moleküler Mekanizması

KKD'yi artıran etkenler çoğunlukla DNA ile kovalent bağlantılar yapan veya DNA tamir mekanizmalarını etkileyen maddelerdir (Morales-Remirez *et al.* 1990, Albanesi *et al.* 1999). Bu maddeler çoğunlukla DNA'ya kovalent bağlarla bağlanırlar veya DNA replikasyonunu dolaylı ya da doğrudan etkilerler. Restriksiyon endonükleazlar ve topoizomerazlar dışında, doğrudan DNA'da çift dal kırığına neden olan ajanlar G1 fazında KKD'de zayıf bir artışa neden olurken (Ceylaner Başkaya 1997), S fazında daha etkilidirler. KKD çoğunlukla bu ajanlar tarafından oluşturulan nokta mutasyonu ve

sitotoksiste ile korelasyon gösterir (Vervecken *et al.* 2000, Smirnova and Klein 2003, Rodriguez-Reyes and Morales-Remirez 2003).

Hücre DNA'sında farklı etkenlerin meydana getirdiği değişiklikler sonucu gözlenen KKD'nin mekanizmasını açıklayan birçok model öne sürülmüştür (Taylor *et al.* 1957).

İlk olarak Taylor vd. (1957), bitki mitotik kromozomlarında (*Vicia faba* ve *Bellenalia romana*) yaptığı otoradyografik çalışmalarda KKD'yi gözlemlemiştir. Gümüş tane modeli olarak adlandırılan bu yöntem, duyarlılığın az olması ve otoradyografinin uzun zaman gerektiren bir işlem olması nedeniyle KKD oluşumunu etkileyen ajanları belirlemede ilgi görmemiştir (Rodriguez-Reyes and Morales-Remirez 2003). Bundan dolayı otoradyografik çalışmaların yerine, timin analogu olan 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) kullanılması, KKD sıklığını daha kolay ve çabuk değerlendirme olanağı vermektedir. KKD analiz yöntemi, BrdUrd kullanımı ve yeni boyama metodlarının geliştirilmesi ile daha da önem kazanmaktadır (Perry and Wolff 1974).

Zakharov ve Egolina (1972), Çin hamster hücrelerinde, timidin analogu olan BrdUrd kullanarak replike olan kromozomların yapısını incelemişlerdir. Bu araştırmacılar Çin hamster hücrelerinde BrdUrd varlığında Fluorecence Plus Giemsa (FPG) boyama yöntemini kullanarak, kardeş kromatidlerin farklı boyandıklarını gözlemişler ve bu görünüm için hücrelerin mutlaka iki replikasyon zamanı geçirmesi gerektiğini belirtmişlerdir. FPG boyama yöntemi sonunda, kromatiddeki DNA ipliklerinin her ikisinin de BrdUrd içermesi açık renk, tek bir ipliğin BrdUrd içermesi ise koyu renk boyanmasına neden olmaktadır (Latt 1974).

KKD oluş mekanizmasını açıklayan bir diğer model olan Replikasyon Bypass Modeli'nde ise DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal maddelerin meydana

getirdiği bir mekanizmadan bahsedilmiştir. Ancak çift KKD oluş mekanizması bu modelle açıklanamamaktadır (Shafer 1977).

Hücrede DNA parçaları aralarındaki değişimi ve KKD oluş mekanizmasını açıklayan diğer bir yaklaşım Holiday Modeli'dir. Bu modele göre hücrelerin BrdUrd varlığında bir mitoz geçirmeleri yeterlidir. Araştırmacılar, BrdUrd'nin kromozomlardaki esas etkisinin paketlenme esnasında olabileceğini açıklamışlardır (Taylor *et al.* 1957). KKD, kromozomun oluşumu sırasında DNA içeriğinin katlanması ile meydana gelmektedir. Restriksiyon endonükleaz kullanılarak yapılan bir çalışmada KKD'nin meydana geldiği bölgelerdeki DNA içeriğinin orta sıklıktaki tekrarlanan dizilerden oluştuğu gösterilmiştir (Ocak 2008).

KKD dağılımı kromozom grupları arasında farklı dağılım göstermektedir. A ve B gurubu kromozomlarındaki KKD dağılımı diğer gruplardan daha sıktır. KKD, G grubu kromozomlarda az sayıda gözlenir. 1 numaralı kromozomun sentromerik bölgesinin Adenin-Timin bazları yönünden zengin olması nedeniyle BrdUrd ile etkileşim daha fazla olacağından KKD daha sık görülür. Ayrıca kromozom uzunluğu arttıķça KKD dağılımının arttığı gösterilmiştir (Evans *et al.* 1974).

KKD oluş mekanizmasını incelemek için tetraploid hücreler kullanılmıştır. Tetraploid hücreler, ilk replikasyonun sonunda kolşisin eklenmesiyle iki DNA replikasyonu arasındaki bölünme durdurularak elde edilir. Bu hücrelerin BrdUrd ile iki replikasyon zamanını geçirmesi gerekir. S1 evresinde DNA sentezi başlamaktadır. Ortamda bulunan BrdUrd yeni sentez edilen DNA'da timin yerine geçmektedir. DNA'da kırılma ve kromatidler arasında değişim meydana gelmektedir. Ortamda bulunan BrdUrd, yeni sentez edilen DNA'nın yapısına girmektedir (S2 evresi). DNA'da kırılma meydana gelmekte ve kromatidler arasında KKD oluşmaktadır (Shafer 1977, Cheng *et al.* 1978, Ocak 2008).

Yapılan araştırmalar sonucunda kanın çalışılma zamanının, bireylerin sağlık durumları ve yaşam tarzları ile ilgili biyolojik faktörlerin (Barale *et al.* 1998, Albertini *et al.* 2000), yaşın, ilaç kullanımı, çeşitli hastalıkların, gebeliğin (Barale 1998), sigara kullanımı (Jakab *et al.* 2001, Gülten *et al.* 2002), genetik faktörlerin (Slapsite 2000), diyetin (Krishnaja and Sharma 2003) ve cinsiyetin (Wulf *et al.* 1986) KKD sıklığını etkilediği tespit edilmiştir. Ayrıca kültür süresi (Surrallas *et al.* 1995), kültür ortamının sıcaklığı (Surrallas *et al.* 1995, Barale *et al.* 1998), besiyeri, serum, mitoz uyarıcılar, antibiyotikler (Barale 1998), BrdUrd'nin konsantrasyonu (Krishnaja and Sharma 2003), karanlık ortam (Konac *et al.* 2005), kolşisin konsantrasyonu, hipotonik çözelti ve fiksasyon (Evans 1983, Tanrıverdi 1991) gibi kültür şartları ile ilgili faktörlerin KKD frekansını değiştirdiği de bilinmektedir.

Mikronükleus Testi

Mikronkleuslar, bölünen hücrelerde kardeş nükleuslara katılamayan asentrik kromozom fragmentleri veya tüm kromozomlardan ortaya çıkan küçük ve ekstrasklear oluşumlardır (Int. Kyn. 6).

MN testi sitogenetik hasarın tespitinde, kromozom analizine göre daha kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanılan bir testtir (Naccarati *et al.* 2000).

İnsan periferel kan lenfositlerinde MN sıklığının kromozom hasarlarının bir göstergesi olarak kullanılması ilk kez Countryman ve Heddle (1976) tarafından önerilmiştir. Ancak daha sonra bu yöntem Fenech ve Morley (1985a, b) tarafından geliştirilmiş ve sitokinezi-blok mikronükleus (CBMN) ismi verilmiştir. İnsan hücrelerinde DNA

hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesini sağlayan MN yöntemi genetik toksikoloji alanında çok yoğun olarak kullanılmaktadır (Fenech 1993, Lando *et al.* 1998). MN sayısındaki artış, çeşitli maddelerin hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Zijno *et al.* 1994).

Anöploidiyi uyaran maddeler, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak, klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna yol açarlar (Demirel ve Zamani 2002). Bu nedenle MN testi hücrelerde hem klastojenik hemde anöjenik etkilerin bir arada değerlendirilmesine olanak veren tek biyomarkırdır (Fenech 1993).

MN yönteminin geliştirilmesinde en önemli adım; MN oluşumuna izin veren, bir çekirdek bölünmesini tamamlamış hücrelerin sayılmasının esas alınmasıdır (Fenech *et al.* 1999). Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır.

Plazma membranında yüksek moleküler ağırlığa sahip bazı kompleksler mevcuttur. Bunlar aktin polimerizasyonu ve dolayısıyla da mikrofilamentlerin bir araya geliş sürecini indüklemektedir. Mikrofilamentlerin bir araya gelmesi plazmadaki yarıklanma başlangıcı için gereklidir. Cyt-B mikrofilament aktivitesini inhibe ederek sitokinezisi durdurur. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Countryman ve Heddle (1976)'ın kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde

görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır (Countryman and Heddle 1976, Kutbay 2001, Demirel ve Zamani 2002).

Countryman ve Heddle (1976)'ın kriterlerine göre:

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması
3. MN'lerin asıl çekirdeğe bağlı veya bitişik olmaması
4. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esaslarını kapsamaktadır (Demirel ve Zamani 2002).
5. MN feulgen pozitif veya diğer DNA'ya özel reaksiyonlarda pozitif reaksiyon göstermelidir
6. MN'ler sitoplazması iyi gözlenen hücrelerde sayılmalıdır
7. MN oluşumu doza bağlı olmalıdır (Almassy *et al.* 1987).

MN test yöntemini sitogenetik anormallikleri belirlemede etkili bir metod yapan; farklı hücre tiplerinde *in vitro* şartlarda yaygın uygulanabilirliği ve sayım kolaylığıdır. Ayrıca elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar (Fenech *et al.* 1999). Fenech vd. (1997) MN test yönteminde kinetokor veya sentromeri belirleyen metodlar kullanarak; kromozom kırığı nedenli MN ile kromozom geri kalması nedenli MN'leri birbirinden ayırmanın kolay olduğunu belirtmiştir.

Kardeş kromatid değişiminde bahsedildiği gibi *in vitro* veya *in vivo* şartlarda sigara ve alkol kullanımı (Maffei *et al.* 2002), yaş (Thierens *et al.* 1996), cinsiyet (Barale *et al.* 1998), çeşitli kronik ve enfeksiyonel hastalıklar, yaşam tarzı, ilaçlar ile fiziksel ve kimyasal maddelere maruziyet (Neri *et al.* 2003, Pelevina *et al.* 2005) gibi faktörler MN'lerin oluşmasında etkili olmaktadır. Sonuç olarak, uzun zamandan beri

uygulanan ve geliştirilen bir sitogenetik teknik olan MN testi, mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal maddelerin meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde güvenli bir metod olarak kullanılabilir (Fenech 2000).

Diğer Önemli ve Yaygın Testler

Kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri dışında yine çok yaygın olarak kullanılan diğer test sistemleri de mevcuttur. Bunlardan en önemlileri Comet testi ve HPRT (hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz) yöntemidir. Comet testi, DNA sarmal kırılmalarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir (Fairbairn *et al.* 1995). Bu yöntem iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesme-çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanılarak belirleyebilmektedir (Ostling and Johanson, 1984; Singh *et al.* 1984). Comet testi hücrelerin metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (Chetalat *et al.* 1996; Kasamatsu *et al.* 1996). HPRT (hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz) yöntemi ise; somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ya da *in vitro* ortamlarda farklı memeli kültür hücrelerinde, pozitif olarak seçilmesi prensibine dayanır. DNA baz çifti değişimlerini, büyük ya da küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya yeteneğine sahip olan bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Cole and Skopek 1994, Albertini *et al.* 2000).

2.5 Literatür Özetleri

2.5.1 Ames Testi ile Yapılmış Olan Çalışmalar

İlk defa 1967 yılında Brezilya’da hummaya sebep olan bir sivrisinek olan *Aedes aegypti* için kullanılan organik fosforlu bir pestisit olan Temephos’un Ames test sistemi ile mutajenitesi araştırılmıştır. Bu pestisit Ames testinde *S. typhimurium* suşları ile S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda yapılan çalışmalarda TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşlarında mutajenik bir etkiye neden olmamıştır. Ancak TA98NR, YG7104 ve YG7108 suşları ile yapılan deneylerde S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda Temephos’un 3.33 μM ’ın üzerindeki konsantrasyonları mutajenik bulunmuştur (Aiub *et al.* 2002).

Buğdaylar içerisindeki yabancı yulafların kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılan ve seçici bir herbisit olan Triallate, *in vitro* çalışmalarda çok karma sonuçlar meydana getirmiştir. Triallate Ames testinde, çoğunlukla S9 fraksiyonu varlığında TA100 ve TA1535 suşlarında genotoksiktir. S9 fraksiyonu yokluğunda ise aynı suşlarda daha zayıf bir cevap gözlenmiştir. TA1537 ve TA1538 suşlarında genotoksositeye rastlanmazken TA98 suşunda ise karma bir sonuç elde edilmiştir (Healy *et al.* 2003).

Brooks vd. (1982), Tetrachlorvinphos’un mutajenitesini *E. coli* WP2 ve WP2 uvrA, *S. typhimurium* TA1535, TA1538, TA98 ve TA100 suşları ile belirlemeye çalışmış ve S9 fraksiyon varlığı ve yokluğunda herhangi bir mutajeniteye rastlanmadığını saptamıştır.

Bir organik fosforlu insektisit olan Chlorpyrifos'un genetik toksisitesi birçok mutajenite testinin yanı sıra Ames testi ile de incelenmiş ve bu incelemelerin hiçbirinde Chlorpyrifos için genotoksik aktivite göstergesi bulunamamıştır (Gollapudi *et al.* 1995).

Bilgin (1992), organik fosforlu bir insektisit olan Triklorfon'un mutajenik potansiyelinin belirlenmesi için prokaryotik ve ökaryotik mutajenite test sistemlerini kullanmıştır. Ön çalışma olarak uygulanan Ames testi Triklorfon'un 1×10^{-10} M ve 1×10^{-12} M kadar küçük dozlarda bile metabolik aktivasyon gerektirmeksizin mutajenik etkisi olduğunu göstermiştir.

Organik fosforlu pestisitler olan Methyl parathion, Methyl paraoxon ve Benzo(a)pyrene'in mutajenik aktivitesini belirlemek için *S. typhimurium* TA98 suşu kullanılarak Ames testi gerçekleştirilmiş ve bu organik fosforlu pestisitlerin yalnız başlarına mutajenik olmadığı ancak Benzo(a)pyrene ile indüklendikleri zaman ise revertant koloni sayısında önemli bir artış olduğu gözlenmiştir (Hreljac and Filipic 2009).

Parathion-methyl'in mutajenik aktivitesi *S. typhimurium* TA100 suşu ile belirlenmeye çalışılmış ve bu kısa zamanlı test sisteminde bu madde mutajenik bulunmuştur (Coral *et al.* 2009).

Organik fosforlu pestisit grubundan olan Phosphobetaines ve Alpha-aminophosphoryl bileşiklerinin Ames testi ile mutajenik aktiviteleri test edilmiş ve bunlardan Phosphobetaines sitotoksik etki göstermezken Alpha-aminophosphoryl bileşiklerinin mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Ilinskaya *et al.* 2004).

Yaygın kullanılan bir organik fosforlu pestisit olan Dicrotophos'un mutajenik aktivitesi TA97a, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşları kullanılarak Ames testi ile araştırılmıştır. Bu maddenin tüm bu suşlarda anlamlı bir değişime sebep olduğu yani mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Wu *et al.* 2010).

6 pestisit (Atrazine, Captafol, Captan, Chlorpyrifosmethyl, Molinate ve Tetrachlorvinphos) mutajenik ve genotoksik aktivitesi Ruiz ve Marzin (1997) tarafından Ames testi ve SOS kromotesti ile araştırılmıştır. Çalışma S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiş olup bunun sonucunda elde edilen verilere göre Captan ve Captafol her iki test sisteminde de genotoksik bulunmuştur. Ancak hem Ames hem de SOS kromotestinde geriye kalan dört pestisit (Atrazine, Molinate, Chlorpyrifosmethyl ve Tetrachlorvinphos)'in genotoksik olmadığı bulunmuştur.

Azinphosmethyl, Diallate, Dichlorvos, S-ethyl dipropyl (EPTC), Fenchlorphos, Mevinphos, Monocrotophos, Noruron, Parathionmethyl, Triallate, Trichlorphon ve Vegadex olmak üzere 12 tane pestisit Ames testi ile mutajenitesi test edilmiş ve *S. typhimurium* TA1535, TA1536, TA1537 ve TA1538 suşları kullanılmıştır. Bu maddelerden Dichlorvos yan dalında dichlorovinyl grubu taşıyan organik fosforlu bir insektisit olup TA1535 suşunda mutajenik bulunmuştur (Carere *et al.* 1978).

S. typhimurium ve *E. coli*'nin suşları ile Fenitrothion'un mutajenitesi belirlenmiş ve bu maddenin *S. typhimurium* TA100 suşunda zayıf mutajenik aktivite gösterirken TA98, TA1535 ve TA1537 ile *E. coli* WP2uvrA suşlarında hem S9 fraksiyonu varlığında hem de yokluğunda mutajenik olmadığı tespit edilmiştir (Hara *et al.* 1989).

Konuk vd. (2008), TA98 ve TA100 suşları kullanarak Piperophos (organik fosforlu herbisit) ve Fenchlorphos (organik fosforlu insektisit) pestisitlerinin S9 varlığı ve

yokluğunda mutajenik aktivitesini çalışmışlar ve bunlardan sadece Piperophos TA98 suşunun S9 fraksiyonu varlığında mutajenik olarak tespit etmişlerdir.

2.5.2 Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Testleri ile Yapılmış Olan Çalışmalar

Organik fosforlu insektisit grubundan olan Malathion'un genotoksik potansiyeli KA, Mİ ve DNA hasarı bakımından araştırılmıştır. Bunun için Sprague-Dawley cinsi ratların periferik kan ve kemik iliği kullanılmış ve 4 grup oluşturulmuştur. Malathion ratlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve 2,5, 5, 10 ve 20 mg/kg olmak üzere 4 doz çalışılmıştır. Bunun sonucunda Malathion'un DNA hasarı yüzdesini ve yapısal kromozom anomaliliklerini önemli derecede artırdığı buna karşılık Mİ'de ise azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir (Moore *et al.* 2011).

Ayrıca Nicholas vd. (1979) tarafından yine Malathion'un insan fetal fibroblastlarında KKD sıklığı üzerine etkileri araştırılmış ve Malathion bir ve iki defa fibroblastlara uygulanmıştır. Sonuçlara göre bir defa maruz bırakılan hücrelerde 40 µg/ml konsantrasyonunda KKD sıklığında önemli bir artış kaydedilmiştir. İki defa uygulama yapılan hücrelerde 20 µg/ml dozda ise çok yüksek derecede bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Meksika'da ortalama 7 yıl boyunca pestisite maruz kalmış olan 25 kadın ve 45 erkek üzerinde genotoksik hasar saptanmaya çalışılmıştır. Bunun için periferik kan lenfositlerinde KKD ve yanak mukozasında ise MN testi ve diğer nükleer anomaliler tespit edilmeye çalışılmıştır. Bunun yanı sıra Pİ ve Mİ'de araştırılmıştır. Kontrol grubunu ise pestisite maruz kalmayan 70 kişi (21 bayan, 49 erkek) oluşturmuştur. Analizler yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımının genetik hasar üzerinde önemli bir

etki göstermediğini ancak pestisite maruz kalma süresi ile KKD sıklığı arasında bir korelasyon olduğunu ispat etmiştir (Martínez-Valenzuela *et al.* 2009).

Chlorpyrifos'un DNA hasarı üzerine etkileri bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus*'ta MN testi ile araştırılmış ve 203,01 g/L konsantrasyonda MN frekansı oldukça yüksek bulunmuştur. En yüksek DNA hasarına ise 5. gün de rastlanmıştır (Ali *et al.* 2008).

Yine Chlorpyrifos'un genetoksitesi Yin vd. (2009) tarafından Çin kara kurbağasında (*Bufo bufo gargarizan*) comet ve MN testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için öncelikle Chlorpyrifos'un akut toksisitesi belirlenmiş ve iribaşlar 96 saat boyunca bu maddenin sublethal konsantrasyonlu serilerine (0,08, 0,16, 0,32, ve 0,64 mg/L) maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak farklı konsantrasyonlara maruz kalmış olan iribaşların kontrol grubuna göre MN'yi önemli derecede indüklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca 0,08 mg/L'lik doz dışında bütün konsantrasyonların da süreye bağlı olarak MN'yi indüklediği tespit edilmiştir.

Gollapudi vd. (1995) tarafından Chlorpyrifos'un Ames testi ve memeli hücre kültürü (CHO/HGPRT deneyi) ile gen mutasyonları, *in vitro* (rat lenfosit KA testi) ve *in vivo* (fare kemik iliği MN testi) teknikler ile sitogenetik anomalileri, DNA hasarı ise *in vitro* rat hepatositlerinde MN testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu test sistemlerinden hiç birinde bu maddenin herhangi bir genotoksik aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir.

Ergene vd. (2007), yaptıkları bir çalışmada ise Göksu Deltası çevresinde yaşayan insanların maruz kaldığı pestisitlerin insanlarda yaptığı genetik hasarı belirlemeye çalışmışlardır. Bunun için ise KA ve KKD testleri için insan kan lenfositleri, MN testi için ise yanak epitel hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışma için 16 sigara kullanan, 16 sigara kullanmayan ve 16 tane de kontrol grubu belirlenmiş ve genetik hasar tespit

edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde kontrol grubuna göre MN sıklığı yüksek derecede artmıştır. Ayrıca sigara kullanımı MN artışı üzerinde önemli derecede bir etkiye neden olmuştur.

Methyl parathion ve Phosphamidon'un balık solungaç dokularında KKD ve KA üzerine etkilerine bakılmıştır. Balıklar 96 saat boyunca 0,05, 0,1 ve 0,2 ppm dozlarında Metil parathion ve 0,5, 1,0, ve 2,0 ppm Phosphamidon'a maruz bırakılmış ve bu sürenin sonunda kontrol grubuna göre KKD ve KA'da önemli derecede artış olduğu gözlenmiştir (Das and John 1999).

Dolara vd. (1992) tarafından yapılan bir çalışmada belirlenen 4 pestisit sitogenetik etkileri araştırılmıştır. Bu pestisitlerden Dimethoate ve Omethoate önemli iki organik fosforlu insektisitlerdir. Yapılan çalışma sonunda bu pestisitlerin doza bağlı olarak insan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda KKD frekansını yükselttikleri tespit edilmiştir.

Organik fosforlu pestisitlerden olan Methyl parathion veya Folidol, Dimethoate veya Rogor, Phoxim veya Bay 77488 ve Methyl azinfos veya Gusathion'un sitogenetik etkileri insan lenfositlerinde KKD ile araştırılmıştır. Methyl parathion, Dimethoate ve Phoxim pestisitleri ile pozitif sonuçlar elde edilirken Methyl azinfos ile yapılan çalışmalarda ise negatif sonuçlar saptanmıştır. Ancak bütün maddelerin yüksek konsantrasyonlarının genel olarak KKD'yi hasarlı hücrelerin ölümüne neden olarak muhtemelen toksisite nedeniyle azalttığı tespit edilmiştir (Gomez-Arroyo *et al.* 1987).

Sivikova and Dianovsky (2006), sığır periferik lenfosit kültüründe, organik fosforlu bir pestisit olan Glifosat'ın sitogenetik etkilerini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada 560-1120 µmol/L Glifosat uygulanan grupta kromozom bozukluklarında kontrol grubuna göre artış olduğunu ancak istatistiksel olarak bu artışın önemli olmadığını

saptamışlardır. Aynı çalışmada KKD sıklığında Glifosat uygulamasının 24. saatinde anlamlı değişiklikler kaydedilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada organik fosforlu pestisitlerden olan Malathion ve Chlorpyrifos'a maruz kalan 40 işçi ile hiç bu pestisitlere maruz kalmamış 30 kişi denek olarak kullanılarak bu pestisitlerin sitotoksitesine bakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda bu pestisitlere maruz kalan işçilerde KA'da önemli derecede artış gözlenmiş olup bu işçilerde kromozom kırıklarına, kromatid gaplara, izokromatid kırıklara, disentrik ve halka kromozomlara rastlanmıştır ve bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında anomaliliklerde önemli derecede bir artış saptanmıştır. Ayrıca bu değerler sigara içen ve bu pestisitlere maruz kalmış kişilerde sigara içmeyenlere göre daha fazla bulunmuştur. Bu bulgularda bu iki pestisit mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Omari 2009).

Organik fosforlu pestisitler tarafından zehirlendiğine tanı konulan 40 hasta (20 bayan ve 20 erkek) üzerinde yapılan araştırmada bu pestisitlerin genotoksik ve sitotoksik aktiviteleri saptanmaya çalışılmıştır. Hastalardan kan alınarak KA, KKD, MN testleri ile Mİ, Pİ ve CBPİ değerlendirilmiş ve kanlar acile gelen hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında alınmıştır. Sonuç olarak tedavi öncesinde alınmış kan örneklerinde sonrasındakilere göre KA, Mİ ve CBPİ değerlerinde artış gözlenmiştir. Ancak KKD, MN sıklığı ve Pİ'de herhangi bir farklılığa rastlanmamıştır (Satar *et al.* 2009).

Malathion'un 4 farklı konsantrasyonu (0,02, 0,2, 2 ve 20 µg/ml) ile 24 ve 48 saat uygulama süreleri şeklinde uygulanarak KKD, KA ve Mİ sıklığı parametreleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak Malathion KKD ve KA testlerinde doza bağlı bir artış gösterirken, Mİ değerlerinde ise tüm dozlarda önemli derecede bir azalış gözlenmiştir (Balaji and Sasikala 1993).

Gardona ve Dursban insektisitlerinin sitogenetik etkileri fare dalak hücrelerinde KA ve KKD testleri ile araştırılmış olup her iki pestisit de toksik olduğu tespit edilmiştir. Gardona'nın 0,25, 0,50, 1,0 ve 2,0 µg/ml ve Dursban'ın 0,50, 1,0, 2,0 ve 4,0 µg/ml konsantrasyonları kullanılmış olup her iki pestisit de kullanılan tüm dozlarda 4 saat sonra kromozom aberasyonlarını indüklediği saptanmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak KKD sıklığında da artış gözlenmiş olup bu sonuçlar her iki pestisit de fare dalak hücrelerinde mutajenik olduğunu göstermiştir (Amer and Aly 1992).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Ames Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden nutrient broth no:2 Oxoid markalı olup, diğer kimyasallardan magnezyum sülfat, sitrikasit monohidrat, potasyum fosfat, sodyum amonyum fosfat, D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glukoz, agar, sodyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, glukoz-6-fosfat, S9 fraksiyonu, 2-aminofluorene, 2-aminoanthracene ve 4-nitro-o-fenilendiamine Sigma, Sodyum azid ise Riedel'den alınmıştır. Çalışmada kullanılan organik fosforlu pestisitlerden Chlorthiophos Riedel-de Haen, (CAS No. 60238-56-4) ve Anilofos Fluka (CAS No. 64249-01-0)'dan temin edilmiştir.

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: Minimal glukoz agar (MGA) ve Histidin/Biyotin/Ampisilin agar (HBA) plakları

	<u>1000 ml</u>
Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
Sitrikasit monohidrat	100 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 g

Sodyum amonyum fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 175 g

Distile su (45 °C) 670 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya eklenmiştir. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanıp otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml olarak)

250 ml

D-Biyotin (F.W. 247,3) 30,9 mg

L-Histidin-HCl (F.W. 191,7) 24,0 mg

Distile su 250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş, daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Solüsyon +4 °C'de saklanmıştır.

(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

100 ml

Ampisilin trihidrat 0,8 g

0,02 N Sodyum hidroksit 100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02 N NaOH içinde çözülmüş ve sterilizasyon için 0,22 mµ çaplı filtreden geçirilmiş ve +4 °C’de saklanmıştır.

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü

	<u>100 ml</u>
Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole ve distile su karıştırılmış ve solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konup +4 °C’de saklanmıştır.

(%0,13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>50 ml</u>
D-biyotin	0,65 mg
Distile su	50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%0,5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	<u>400 ml</u>
L-Histidin-HCl (F.W. 191,7)	2 g
Distile su	400 ml

Madde distile su içinde çözülmüş ve otoklavda 121 °C’de 20 dk sterilize edilmiştir.

(%20) Glukoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	<u>100 ml</u>
Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklavda 110 °C’de 15 dk sterilize edilmiş ve 0-4 °C’de saklanmıştır.

(2 µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO)’de çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. +4 °C’de saklanmıştır.

	<u>10 ml</u>
2AF	0,02 g
DMSO	10 ml

(0,02 µg/µl) 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

2 µg/plak olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

	<u>10 ml</u>
NPD	0,02 g
DMSO	10 ml

(0,1 µg/µl) Sodyum Azid (SA)

Kullanım: Pozitif kontrol

10 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. +4 °C'de saklanmıştır.

	<u>100 ml</u>
Sodyum azid	0,01 g
Distile su	100 ml

(0,005 µg/µl) Mitomycin C (Ames testi için)

Kullanım: Pozitif Kontrol

0,5 µg/plak başına olmak üzere DMSO’da çözülerek kullanılmıştır. TA102 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır.

	<u>100 ml</u>
Mitomycin C	0,005 g
DMSO	100 ml

(0,05µg/µl) 2-Aminoanthracene (2AA)

Kullanım: Pozitif Kontrol

5 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA100 ve TA102 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır

	<u>100 ml</u>
2-aminoanthracene	0,005 g
DMSO	100 ml

(8 mg/ml) Tetrasiklin

Kullanım: TA 102 suşu için gecelik kültür hazırlanması

	<u>10 ml</u>
0,02N HCl	10 ml
Tetrasiklin	0,08 g

Maddeler karıştırılmış ve 0,22 µm'lik filtre ile filtre edilmiştir. Alüminyum folyoya sarılarak +4 °C'de saklanmıştır.

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

	<u>1000 ml</u>
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Agar, su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülmüş ve otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir.

Histidin/Biyotin Plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

	<u>1000 ml</u>
Agar	15 g
%20 glukoz	50 ml
Histidin HCl. H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
50XVB	20 ml
Distile su	914 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin ilave edilmiş, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtılmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	<u>1000 ml</u>
Agar	15 g
Distile su	910 ml
50XVB tuzları	20 ml
%20 glukoz	50 ml

Histidin HCl.H ₂ O	10 ml
0,5 mM Biotin	6 ml
(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin	3.15 ml

Agar ve su otoklavlanmış, 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 30 ml olarak aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler 4 °C'de 2 ay saklanabilmektedir.

Histidin/Biyotin/Ampisilin/Tetrasiklin Plakları

Kullanım: TA102 suşu için besiyeri

	<u>250 ml</u>
Agar	3,75 g
Distile su	215 ml
%20 glukoz	25 ml
50x VB tuzu	5 ml
Histidin çözeltisi	2,5 ml
Biyotin çözeltisi	1,5 ml
Ampisilin çözeltisi	780 µl
Tetrasiklin çözeltisi	62,5 µl

Agar ve su otoklavlanmış, 45 °C'ye soğutulup % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin, ampisilin ve tetrasiklin çözeltileri eklenip plaklar petrilere 25 ml olarak aktarılmıştır.

Minimal Glukoz Agar Plakları

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>1000 ml</u>
Agar	15 g
Distile su	930 ml
50X VB	20 ml
%20 glukoz	50 ml

Agar ve su 2 L'lik kapta karıştırılıp çözülmüş ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz ve 50XVB tuzları eklenip petri kutularına 30 ml olarak aktarılmıştır.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü

	<u>1000 ml</u>
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve su 2 L'lik kapta karıştırılıp otoklavlanmış ve petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	<u>200 ml</u>
Oxoid nutrient broth no:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121 °C'de 20 dk sterilize edilip 4 °C'de saklanmıştır.

Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml</u>
Potasyum klorür	61,5
Magnezyum klorür	40,7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözülmüş ve 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edilip 4 °C'de saklanmıştır.

0,2 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>500 ml</u>
0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	13,82 g
0,2 M Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	14,2 g
Distile su	500 ml

Karışım pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

0,1 M β -NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	<u>5 ml</u>
β -NADP (F.W. 765,4)	383 mg
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

1 M Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	<u>10 ml</u>
Glukoz-6-fosfat	2,82 g

Steril distile su	10 ml
-------------------	-------

Sterilizasyon 0,22 µm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	<u>50 ml</u>
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
MgCl ₂ -KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glukoz-6-fosfat	0,25 ml
0,1 M β-NADP	2 ml
0,2 M fosfat tamponu pH=7,4	25 ml
Steril distile su	19,75 ml

Karışım, her zaman taze olarak ve yeterince hazırlanmıştır. İçerikler daima buz içinde tutulmuştur.

3.1.2 Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Kromozom Medyumu (Biochrom Cat. No. F5023)

Bu çalışmada hücre kültürü için, Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler verilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids.....850 ml

Heparin.....25 000 E

Penicillin G, Sodium Salt.....75 000 E

Streptomycin Sulphate.....50 mg

Phytohemagglutinin M.....2,5 mg

Bu medyum steril kültür tüplerine her tüpe 2,5 ml olacak şekilde steril şartlarda paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır.

Kolşisin (Sigma Cat. No. C9754)

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak kolşisin kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0,06 µg olacak şekilde (0,06 µg/ml) 2,5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir.

Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37 °C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

Fiksatif

KKD ve KA deneylerinde 1 hacim asetik asitin 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır. MN deneyleri için birinci fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol ve 6 hacim %0,9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/%0,9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanolün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

5'-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma Cat. No. B 5002)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir.

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril saf su içinde BrdUrd maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0,2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

KKD'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11,34 g KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4,8).

Tampon B: 14,83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9,3).

Işınlama eriyiği

5 ml Sorensen Tampon A

5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6,8).

Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11,05 gr trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 21,9 gr NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktararak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir.

Hazırladığımız bu stok eriyik 5XSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. Deneyimizde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1XSSC kullanılmıştır.

Giemsa (Sigma Cat. No. 9204)

Deneylelerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiğı preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması:

5 ml tampon A,

5 ml tampon B

5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6,8).

Entellan (Merck Cat. No. 7961)

Preparat kapatma solüsyonudur. Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

Mitomycin C (MMC)

Pozitif mutajen olarak kullanılmıştır. KA ve KKD test yöntemi için 0,25 µg/ml MMC, MN test yöntemi için 0,20 µg/ml MMC'nin aberasyonlara neden olduğu tespit edilmiş ve pozitif kontrol olarak bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Cytochalasin B (Sigma CAS No. 14930-96)

MN testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Bu eriyikten 16 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde Cyt-B içermiştir.

Deneyde Kullanılan Deney Ekipmanları

- Nüve soğutmalı inkübatör ES110
- 0,0001 g hassasiyetindeki Sartorius marka terazi
- Nüve OT 4060 Otoklav
- Hanna Instruments H1221 pH metre
- Devir hızı 4 000 rpm'e kadar yükselebilen Hettich Universal marka santrifüj
- Olympus CH20 marka ışık mikroskobu
- BM 302 NÜVE marka 0-60 °C ayarlanabilir, zaman ayarlı su banyosu
- UV ve floresan ampülü olan Labormed marka flow (steril) kabin
- +4-8 °C arasında olan derin donduruculu (Profilo) buzdolabı
- Polietilen, vida kapaklı steril kültür tüpleri
- 24x76 cm'lik lam ve buna uygun ebatlarda 24x60 mm lameller
- 5 cc'lik plastik steril enjektörler

3.2 Metot

3.2.1 Ames Testi

S. typhimurium Test Suşları

Deneyde, Maron ve Ames (1983) tarafından, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşları kullanılmıştır (Maron and Ames 1983). Bu suşlar Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri'nden olan Prof. Dr. Nuran Diril'den temin edilmiştir. TA97 ve TA98 suşları kodon kayması, TA100 suşu baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların ve TA102 suşu ise oksidatif tipi ve ochre tipi mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

Test Maddeleri

Denenen maddeler DMSO içinde çözülmüşler ve +4 °C'de saklanmışlardır. Sitotoksik dozun belirlenebilmesi için bir ön çalışma yapılmış ve Anilofos için 1000 µg/plak, 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak ve 0,1 µg/plak konsantrasyonları, Chlorthiophos için ise 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak ve 0,01 µg/plak konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Bu çalışmada, test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, mikrozomal fraksiyonun hazırlanması ve Ames testi Maron ve Ames (1983) yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile

yapılmıştır (Maron and Ames 1983). Deneyler S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki grup halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

***Salmonella* Suşlarına Ait Kùltürlerin ve Master Plaklarının Hazırlanması**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakùltesi'nden getirilen bakteri suşları HBA plaklarına paralel ekimleri yapıp 37 °C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml NB ortamı içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kùltür alınıp HBA üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar 4 °C'de 2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

***Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kùltürlerin Açılması**

Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kùltürü ve 90 µl DMSO eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kùltürler stok olarak kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kùltürler 1-2 yıl süre ile tazeliklerini korumaktadır.

***Salmonella* Suşlarının Gecelik Kùltürlerinin Hazırlanması**

TA97, TA98 ve TA100 suşları için, master plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml nutrient broth ve 63 µl ampisilin içerisinde süspanse edilmiş ve 140 rpm'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze kùltür hazırlamak için 16 saatin sonunda bu kùltürlerden 500 µl alınıp 20 ml nutrient broth ve 63 µl ampisilin içerisinde süspanse edilmiş ve 110 rpm'de kullanımına kadar inkübasyonu sağlanmışır. TA102 suşu için ise gecelik kùltürün içerisinde ek olarak bir de 5 µl tetrasiklin ilave edilmiştir.

***Salmonella* Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması**

Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺'lardan ayırt edilir. Bu amaçla NB'de, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme

gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılmıştır.

***uvrB* Mutasyonu Kontrolü**

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir.

Rfa Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB'de bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45 °C su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0,1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kâğıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine

kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R-faktör Varlığı Kontrolü

Test bakterilerinin içediği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütölen NB içinde bakteri költürü (%0,8 Ampisilin/0,02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37 °C’de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedirler.

Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklılığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar; TA100 için 75-200 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C’de, NB’de büyütölen bir gecelik költürden 0,1 ml alınıp, 45 °C’deki su banyosunda tutulan 0,25 ml 0,5 M HB solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C’de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon işleminden sonra kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 110 rpm'de 12-16 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gecelik kültürden 100 µl alınmış ve 20 ml NB bulunan erlen içerisinde eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde bir dizi sulandırması hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl'lik miktarlarda alınarak 45 °C'deki su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak NA plaklarına yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde $1-2 \times 10^9$ ml/bakteri olması öngörülmektedir.

Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Sitotoksik etkinin saptanması deneyi Dean vd. (1985)'e göre yapılmıştır. Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml değişik konsantrasyonlarda uygulanan maddelerden ilave edilmiştir. Öncelikli olarak maddelerin 0,1 µg/plak, 1µg/plak, 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Mutajenite deneylerinde, toksik dozun altındaki dozlarla çalışılmıştır.

S9 Karışımının Hazırlanması

Ames test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NADP, 100 mM Na-fosfat pH:7,4 ve bu karışımın her ml'si için 0,04 ml derişimindeki S9 fraksiyonudur. Karışım her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresince buz içerisinde saklanmaktadır.

Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanır. Ames testi, Maron ve Ames (1983)'e göre yapılmıştır.

S9'suz (-) Deney

Bu amaçla, içlerine 0,25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45 °C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 5 saatlik taze bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37 °C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak iki bağımsız deney yapılmış ve sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol ve pozitif kontrol kullanılmıştır.

S9'lu (+) Deney

Plak inkorporasyon testinde, test bileşigi, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak MGA'ya dökülmüştür. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his⁺ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır. Bu yöntemde, 0,25 ml HB eklenmiş 45 °C'deki 2,5 ml'lik top agara, test suşu kültüründen 0,1 ml, test edilecek kimyasaldan 0,1 ml ve S9 karışımından 0,5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vorteksenerek oda sıcaklığındaki MGA plaklarına yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme, yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgüllüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen kullanarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

3.2.2 Kardeş Kromatid Değişimi ve Kromozom Aberasyon Testi

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen 24-30 yaşları arasında iki bayan ve iki erkekten alınan periferik kan kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin periferik kan kültüründeki genotoksisitesini tespit etmek amacı ile KA, KKD ve MN test yöntemleri kullanılmıştır. Uygulanan test yöntemleri ile KA, KKD ve MN sayıları saptanmış ve bölünme indekslerini tespit etmek için sırası ile Mİ, Pİ ve CBPİ oranları belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak MMC, negatif kontrol olarak ise bu pestisitleri çözen DMSO kullanılmıştır.

Pestisitlerin Konsantrasyonlarının Seçimi

Çalışmada uygulanacak pestisitlerin konsantrasyonlarının seçimi için ön çalışma yapılmıştır. Uygulanacak konsantrasyonlar Mİ inhibisyonu (Mİ)>%50 temeline dayanılarak seçilmiştir (Sivikova and Dianovski 2000).

Negatif Kontrol Konsantrasyonu

Chlorthiophos ve Anilofos organik çözücülerde çözünen bir kimyasal formülasyona sahiptir. Organik çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun konsantrasyonu toksik olmayan miktarda, daha önce yapılan araştırmalara dayanarak seçilmiştir. Doku kültüründe DMSO'ya bağlı anormallikleri, DMSO'da çözünmüş pestisitlerin neden olduğu anormalliklerden ayırmak amacı ile DMSO negatif kontrol olarak seçilmiştir. DMSO'nun kültür ortamında fazla miktarda bulunması, bu kimyasala bağlı anormalliklere neden olacağından ortamdaki konsantrasyonu %1'i geçmemelidir (Laffon *et al.* 2001, González Borroto *et al.* 2001, 2002).

Pozitif Kontrol Konsantrasyonu

Laboratuvar şartlarımızda periferik kan kültürü metodunun standartlar ölçüsünde uygulandığını göstermek amacı ile daha önceden pozitif etkisi kanıtlanmış, anormallik yapan genotoksik bir madde kullanılmıştır. Bunun için KA, KKD ve MN testlerinde pozitif sonuçlar veren MMC seçilmiştir. Kan kültürüne MMC uygulaması sonucu anormallik sayısının istatistiksel açıdan anlamlı olması yöntemin doğru uygulandığını göstermektedir.

Yapılan ön çalışmalar sonucunda; KA ve KKD test yöntemi için 0,25 µg/ml MMC, MN test yöntemi için 0,20 µg/ml MMC'nin aberasyonlara neden olduğu tespit edilmiş ve pozitif kontrol olarak bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce, etiketli olan lamlar dik şaleye dizilmiş ve şale, lamların üzeri iyice örtülecek şekilde 1N HNO₃ çözeltisi ile doldurulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar, yarım saat boyunca akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Hücre Kültürünün Yapılması

1. İnsan periferik lenfosit kültürünün hazırlanması için, sağlıklı, sigara içmeyen ve ilaç kullanmayan iki bayan ve iki erkekte (24-30 yaşları arasında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0,2 ml) steril şartlarda 2,5 ml'lik kromozom medyumuna ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş 1991).
2. Yine steril şartlarda daha önceden hazırlanan BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml medium olacak şekilde ilave edilerek iyice

karıştırılmış ve hücre kültürü 37 ± 1 °C’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. BrdUrd içeren DNA doğal ve yapay ışık tarafından bozulduğu için, hücre kültürü inkübasyon boyunca karanlıkta tutulmuştur.

Test Maddelerinin Uygulanması

1. Test maddelerinin etkisini incelemek amacıyla, bu maddeler 24 saatlik uygulama için kültür süresi başlangıcından 48 saat sonra, 48 saatlik uygulama için ise kültür süresi başlangıcından 24 saat sonra 2,5 ml kromozom medyum B içeren kültür ortamına ilave edilmişlerdir.
2. Chlorthiophos ve Anilofos’un her ikisi için de bu dozlar 25, 50, 100 ve 200 µg/ml olarak belirlenmiştir. Kimyasal maddeler inkübasyon sonuna kadar (hasat işlemi başlayana kadar) kültür ortamında kalmıştır.
3. Ayrıca her deneyin bir spontan kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir negatif kontrolü ve MMC ilave edilmiş bir pozitif kontrolü vardır. Negatif kontrolde, kültür tüpüne 9 µl DMSO/ml olacak şekilde DMSO eklenmiştir. Pozitif kontrolde, kültür tüpüne MMC son konsantrasyonu 0,25 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.
4. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden 20 µl (0,06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Bu şekilde hücreler 37 ± 1 °C’de 2 saat kolşisin ile ön uygulamaya tutulmuştur.

Lenfositlerin İzolasyonu

1. Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri inkübatörden alınarak 2000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
2. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0,5-0,7 ml’lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, hücrelerin şişmesi amacıyla inkübatörde 37  C’ye kadar ısıtılan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetleme yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır.
3. Her tüpe 10 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra ağzı kapatılan tüpler inkübatöre konmuştur. Hücreler 37  C de 5 dk boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilmiştir.
4. S renin sonunda tüpler 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır.
5. Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 10 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir.

6. Oda sıcaklığında 20 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir.
7. İkinci fiksatif işleminden sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra üçüncü fiksatif uygulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada oda sıcaklığında hiç beklenmemiş ve tüpler doğrudan santrifüj edilmiştir.
8. Üçüncü kez fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir leke şeklinde izole olduğu görülmüştür. Son santrifüjden sonra (1200 rpm'de 10 dk) dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Preparat Hazırlanması

1. Tüpün dibinde kalan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.
2. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pastör pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine 45 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır.
3. Her preparattaki farklı alanlara yaklaşık olarak 3 damla kadar süspansiyon damlatılabilir. Hücre süspansiyonunun lamlara dağıtılması esnasında damlaların

üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

1. KA için; en az bir gece kurutulan preparatlar sorensen tamponunda hazırlanan %5'lik giemsa ile 18 dk boyanmıştır.
2. Boyadan çıkan preparatlar distile suda çalkalanmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulmuş, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.
3. Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde sorensen tamponu ile (ışınlama eriyiği) örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.
4. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 wattlık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviole lambası ile 30 dk ışınlandırılmıştır.

5. Işınlama bittikten sonra preparatlar daha önceden sıcak su banyosuna yerleştirilerek ısınması sağlanan 1XSSC eriyiği içerisinde 60 °C ($\pm 0,2$ °C)'de 60 dk inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk önce %5'lik giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.
7. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1XSSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 18 dk boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu süre laboratuvar şartlarına göre değişebilir. Dolayısıyla en uygun boyama süresinin her çalışmada denenerek bulunması daha doğru olur.
8. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.
9. Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

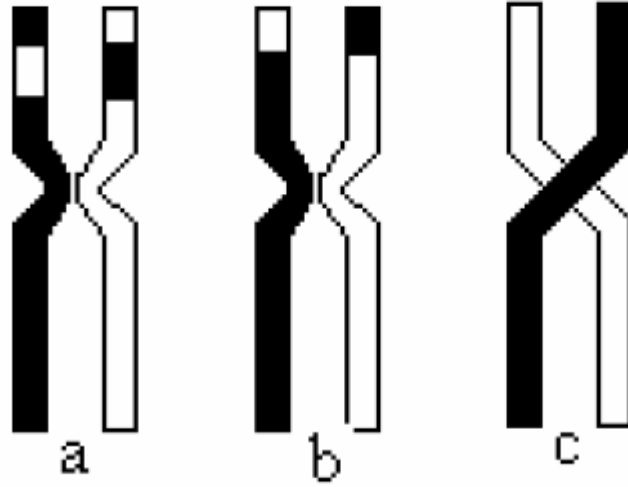
1. Hazırlanmış olan daimi preparatlar ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir ($10 \times 100 = 1000$ büyütmede).

2. Bu incelemeler sırasında KKD sayısı ve KA belirlenmiştir.
3. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır.
4. Bu incelemeler sonucunda Pİ ve Mİ saptanmıştır.

KKD ve Pİ'nin Saptanması

KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücrede) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.1.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır ve Şekil 3.1.b'de gösterilmiştir. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur. Bu durum Şekil 3.1.c'de verilmiştir.



2 KKE

1 KKE

KKE yok

Şekil 3.1 Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit 1990).

Proliferasyon İndeksinin (Pİ) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

Chlorthiophos ve Anilofos'un DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile Pİ bulunmuştur. Bunun için her bireyden tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak Pİ şu şekilde hesaplanmıştır:

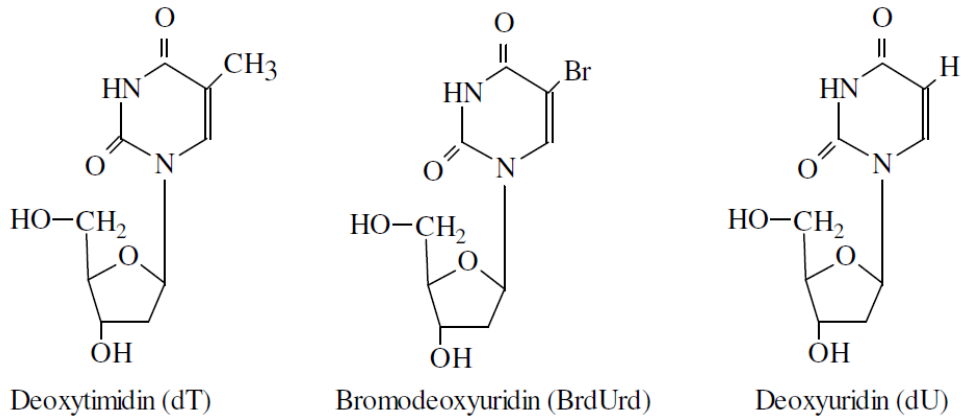
$$Pİ = \frac{1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3}{100}$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü mitozlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5. C atomuna dT’de CH₃, BrdUrd’de Br ve dU’da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



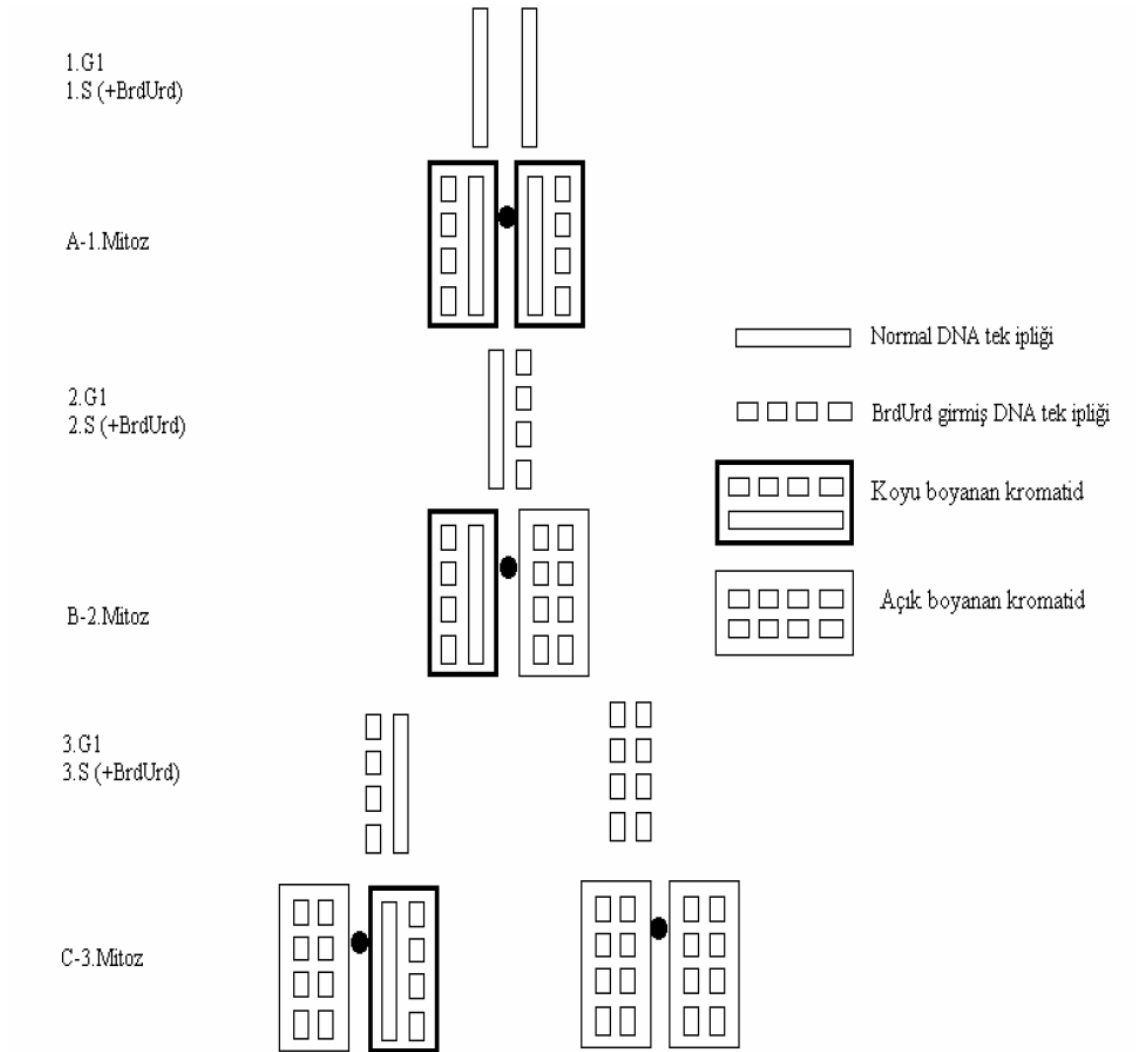
Şekil 3.2 Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (DU)’in kimyasal yapıları

BrdUrd, DNA’nın yapısında bulunan timin bazlarının analoğu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA’sını replike ettiği sırada (1. S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği, içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd’yi alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdUrd:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesine ait şeklin şematik olarak açıklanması Şekil 3.3.A üzerinde gösterilmiştir.

Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd’li ortamda 2. S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine

komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdUrd) oluşturacaktır. BrdUrd'li ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd) kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelere ait şematik görüntü Şekil 3.3.B’de verilmiştir.

Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 3. S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğerkromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğerkromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir üçüncü mitozda ait hücreleri gösteren şematik görüntü Şekil 3.3.C’de gösterilmiştir. İşte bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır.



Şekil 3.3 BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (Topaktaş ve Speit 1990).

Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (Mİ) Saptanması

Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

KA test yöntemi ile hazırlanan preparatlarda iyi dağılmış 46 kromozom bulunan metafazlar tespit edilerek kromozomlarda kromatid kırık, kromozom kırık, kromatid gap, kromozom gap, kromatid değişimi, fragment, halka kromozom gibi aberasyonlar belirlenmiştir.

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (4 kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Mitelman 1995). İncelenen bu 100 hücre içinde yapısal ve total kromozom anormalliklerinin yüzdesi bulunmuştur. Bu çalışmada sayısal kromozom anormalliklerinden daha çok yapısal kromozom anormallikleri belirlenmiştir. Dolayısıyla sayısal kromozom anormallikleri değerlendirmeye alınmamıştır.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gaplar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Kauderer vd. (1991)'nin bildirdiğine göre şu şekilde ayırt edilmiştir:

Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır.

İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları ayrı ayrı saptanmıştır. Mace vd. (1978) ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir.

Mitotik İndeks (Mİ)'in Saptanması

Chlorthiophos ve Anilofos'un mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile mitotik indeks bulunmuştur. Bunun için her kişiye ait preparatlardan toplam 3000 hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 3000 hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak Mİ saptanmıştır.

3.2.3 Mikronükleus Testi

Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

Hücre Kültürünün Yapılması

1. *In vitro* mikronükleus testinde Rothfuss vd. (2000)'nin geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.
2. Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın (24-30 yaşları arasında) iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri

kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0,2 ml) ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş 1991).

3. Hücre kültürü inkübatörde 37 ± 1 °C’de 68 saat için inkübe edilmiştir.

Test Maddelerinin Uygulanması

1. Chlorthiophos ve Anilofos’un etkisini incelemek için 25, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlardaki maddeler kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir.

Ayrıca her deneyin bir spontan kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir negatif kontrolü ve bir pozitif kontrolü vardır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde Cyt-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.

Lenfositlerin İzolasyonu

1. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0,4 KCl) ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır. Hipotonik eriyik, kültüre yavaş yavaş ve pipetleme yapılarak ilave edilmiştir.

2. Kùltür tüpleri 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0,9 NaCl) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir.
3. Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk muameleden sonra 1200 rpm’de 10 dk daha santrifüj edilen tüplere iki kez glasiyal asetik asit/metanol (1/5) ilavesi yapılmış ve 2. fiksatif uygulamasında oda sıcaklığında 10 dk, 3. fiksatif uygulamasında ise hiç beklemeden tüpler santrifüje alınmıştır.
4. Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kùltür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir.
5. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamlar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

Preparatların Boyanması

1. Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5’lik giemsa boyası ile 18 dk boyanmış ve üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır.
2. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3. Hazırlanan daimi preparatlar ışık mikroskopunda $10 \times 40 = 400$ büyütmede incelenmiştir.

Mikronükleus Sayısı ve Sitokinezi-Blok Proliferasyon İndeksi (CBPI)'nin Saptanması

MN sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her uygulama grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 2000 hücre incelenmiş ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca buna ek olarak CBPI oranları hesaplanmıştır. Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland vd. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır:

1. Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır.
2. Benzer olarak, nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır.
3. İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir.
4. MN'ler sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır.
5. MN'ler ana nükleus gibi boyanmalıdır.
6. MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır (Titenko-Holland *et al.* 1997, Fenech 2000).

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu durum, Cyt-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu ve multinükleuslu (>2) hücrelerin

sayılmasıyla yapılır. CBPI Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$CBPI = (MI + 2 \times MII + 3 \times MIII + 4 \times MIV) / N$$

Formüle göre, MI bir nükleuslu, MII iki nükleuslu, MIII üç nükleuslu, MIV dört nükleuslu hücrelerin sayısını, N ise toplam hücre sayısını göstermektedir. CBPI'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech *et al.* 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra CBPI'yi belirlemek için tekrar incelenmiştir. CBPI için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfi seçilmiş alanlarda toplam 2000 hücre (dört kişi için toplam 8000 hücre) incelenmiştir.

Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında x 400 büyütmede yapılmıştır (Olympus BX50). Bu işlem sırasında 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, bazı ilginç kromozom anormalliklerinin ve mikronükleuslu binükleer hücreler ile 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, Mİ, Pİ, CBPİ ve MN parametrelerine ait veriler uygulamalı gruplardan elde edilen sonuçlar ile onların kontrolleri (kontrol, negatif kontrol ve pozitif kontrol) arasındaki farkın önemli olup olmadığı student-t testi ile karşılaştırılmıştır.

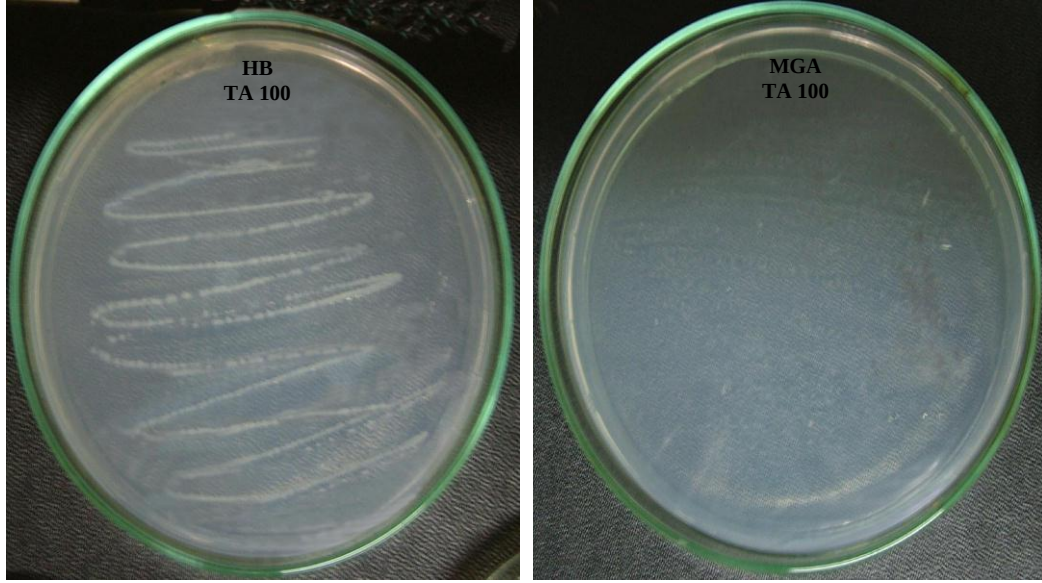
İstatistiksel analizler SPSS 10,0 for Windows istatistik programı ile bilgisayarda yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

4. BULGULAR

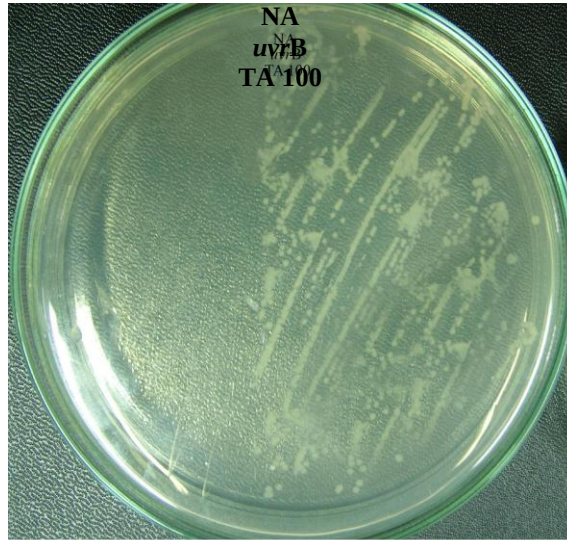
4.1 Ames Testine Ait Bulgular

Ames testi, çalışmada kullanılan pestisitlerin farklı dozlarının mutajenik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla histidin üretemeyen *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 ve TA102 bakteri suşları kullanılmış olup, bu suşların histidin üretebilir hale gelip gelmediklerine bakılarak pestisitlerin mutajeniteleri belirlenmiştir. Histidin üretebilir hale gelen bakterilerin oluşturdukları kolonilerin sayısı, negatif kontrol grubunun koloni sayısı ile karşılaştırılmıştır. Buna göre negatif kontrol grubunun koloni sayısını iki katına çıkaran konsantrasyon değeri mutajenik konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. Koloni sayısında doza bağlı bir artış olma durumunda ise bu maddenin, zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (Mortelmans and Zeiger 2000).

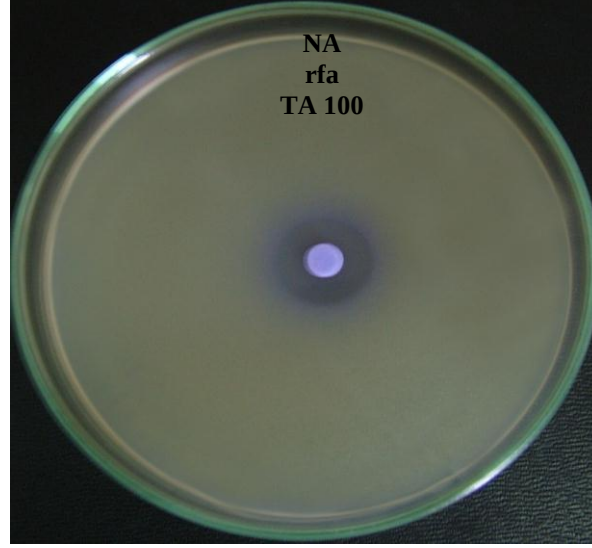
Deney öncesinde tüm suşlar için spontan geri dönüşüm sayısı bulunarak test bakterilerinin deneyler için uygunluğu doğrulanmıştır. Bununla beraber mutant olan bu bakteriler, genetik özelliklerini çok çabuk değiştirebildikleri için her deneyden önce mutlaka genetik kontrolleri yapılarak deney için uygun olup olmadıklarının sağlanması yapılmıştır. Bu bakterilere ait genetik kontroller Resim 4.1, Resim 4.2, Resim 4.3 ve Resim 4.4’de verilmiştir. Genetik kontrollerin yanı sıra kullandığımız pestisitlerin uygulanacak dozlarını belirlemek için denemeler kurulmuş ve her pestisit için sitotoksik dozlar belirlenmiştir. Deney sonunda elde edilen sonuçlar, standart sapmaları ile birlikte ortalamaları alınarak, istatistiksel açıdan Mann-Whitney U testi kullanılarak, çözücü kontrolü olan DMSO sonuçları ile karşılaştırılıp değerlendirilmiştir.



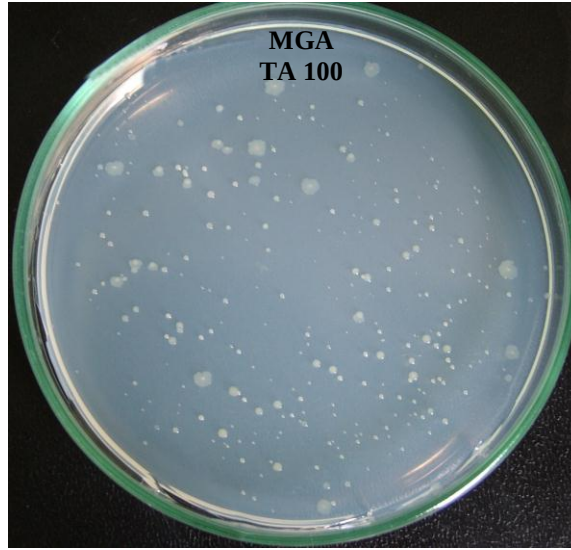
Resim 4.1 *S. typhimurium* TA100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü



Resim 4.2 *S. typhimurium* TA100 suşunun *uvrB* mutasyonu kontrolü



Resim 4.3 *S. typhimurium* TA100 suşunun rfa mutasyonu kontrolü



Resim 4.4 *S. typhimurium* TA100 suşunun spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü

Yapılan testler sonucunda elde edilen bulgulara göre, TA97, TA100 ve TA102 suşların da her iki pestisit de tüm konsantrasyonları hem S9 karaciğer enzimi fraksiyonunun varlığında hem de yokluğunda koloni sayısını iki katına çıkaran bir konsantrasyon tespit edilememiştir. Aynı zamanda doza bağlı olarak koloni sayısında yine bir artış bulunamamıştır. Bu sonuçlar, bu iki pestisit de kullanılan tüm dozlarının bu üç suşta mutajenik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla bu pestisitler TA97 suşunun belirlediği çerçeve kayması mutasyonları, TA100'ün belirlediği nokta mutasyonları ve TA102'nin belirlediği oksidatif tipteki mutasyonlara sebep olmamaktadır.

Chlorthiophos'un mutajenitesini belirlemek üzere yapılan Ames testi sonuçlarına göre bu madde TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan uygulamalar dışında kullanılan tüm suşlarda herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir. Fakat TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda uygulanan beş farklı dozun tümünde kontrol grubunun iki katını aşan değerlere rastlanmıştır. Dolayısıyla bu da maddenin bu suşta mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Anilofos'ta ise yine TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan çalışmada 10 µg/plak, 100 µg/plak ve 1000 µg/plak konsantrasyonlarında kontrol grubu değerinin iki katına yakın değerler elde edilmiş olup bu dozların da mutajenik olduğu dolayısıyla çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabileceği tespit edilmiştir. Ancak TA98 suşunun S9 fraksiyonu varlığında yapılan çalışmalarda ise herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanılmamıştır.

S. typhimurium TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile yaptığımız çalışmada TA98 suşu dışında uygulanan tüm dozların S9 varlığında elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ames testine ait tüm veriler ve istatistiki değerlendirmeler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile denenen pestisitlerin S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda plak inkorporasyon testi sonuçları

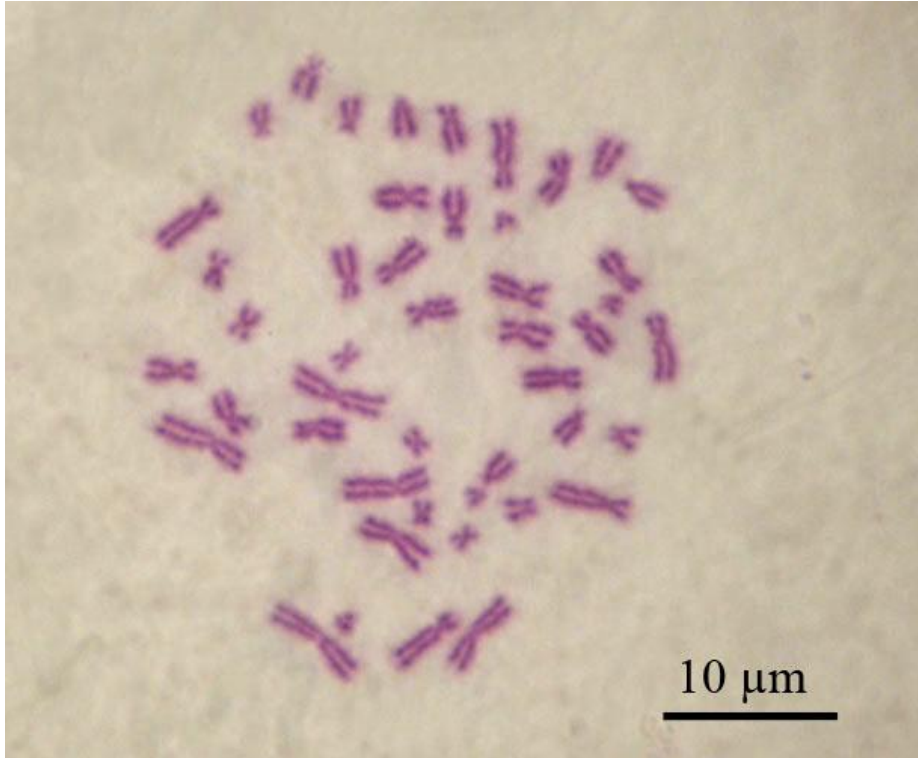
Test Maddesi	Doz (µg/plak)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama± Standart Sapma							
		TA97		TA98		TA100		TA102	
		S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)	S9(-)	S9(+)
Chlorthiophos	100	95±13,3*	120,5±9,6	61,33±10,5*^m	23,5±3,5	96±4,1*	127,66±8,9*	326,5±14*	292±6,7*
	10	101,33±8,4*	109±10*	51,33±7,6*^m	21,83±2*	109±5,9*	121,5±8*	320,16±20,11*	334,66±8,5*
	1	99,33±10*	111±6,7*	49,33±4,6*^m	23±3,2*	113,83±10,7*	142,33±12,5*	325±45,1	346,83±12,9*
	0,1	100,83±8*	125,33±6,7*	55±5,7*^m	21±1,4*	102,83±9	126,5±11,9*	348±18*	305,83±7,6*
	0,01	94,83±3,5*	112,83±10,6	50,5±3,2*^m	24,16±3,8	106,16±9	141,66±7,7*	322,16±12,8	324,16±16,5*
Anilofos	1000	82,16±8,9*	117,16±12,8	47,33±5,7*^m	21,33±4,5*	127,16±3,7*	106,83±10*	278,16±20*	314,33±8,6*
	100	91,66±5,6*	107±10,8*	47,66±5,4*^m	24,33±5,3	98±4,9*	115,33±7,7*	332,16±11,9*	315±7,4*
	10	93,16±11,6*	109±10,6*	47,33±7*^m	21,33±1,9*	105±7,3	132,33±18,8*	296,33±13,1*	304,83±5,8*
	1	93,66±6,2*	119,16±8,6*	40±6,3*	19,33±3,2*	98,66±7,11*	144,33±5,5*	337,5±16,5*	325,66±16*
	0,1	104,66±7,2*	110±11,2*	45±5,9*	19,66±2,3*	107,5±11,2	149,5±6*	325,5±11,4*	295,33±6*
Kontrol		91,66±5,7*	124,66±5,9*	32,16±3,1	29,5±1,5*	118,66±12,8*	149,33±6,2	349±8*	337,33±28,7
DMSO		87,5±4,9	115,33±9,9	32,33±6,5	24,5±2,7	106,5±4,8	156,5±13,4	313±25,91	342±9,4
SA	10					2743±202,8*			
2AF	200		1365,33±100,8*		971,16±32,2*				
NPD	2	1193,33±99,5*		1495±178,4*			2128±310,5*		2207±197*
2AA	5								
MMC	0,5							1739,83±110,9*	

*Kontrolle göre revertant sayısı $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (Mann-Whitney U Testi) *m: mutajen

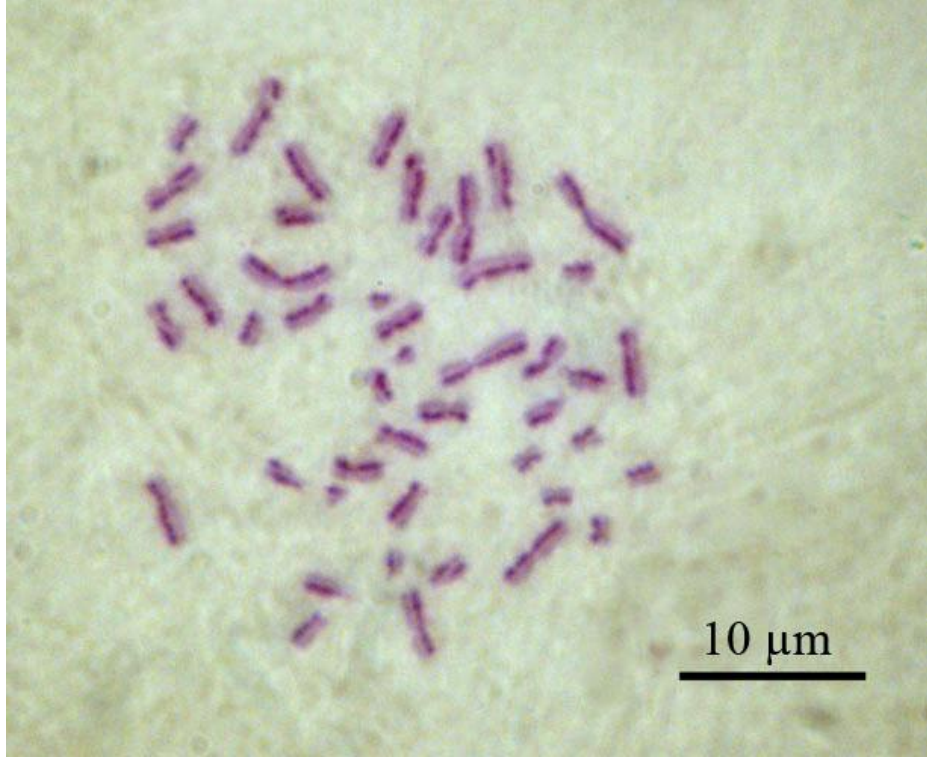
4.2 Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Testine Ait Bulgular

4.2.1 Chlorthiophos'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri

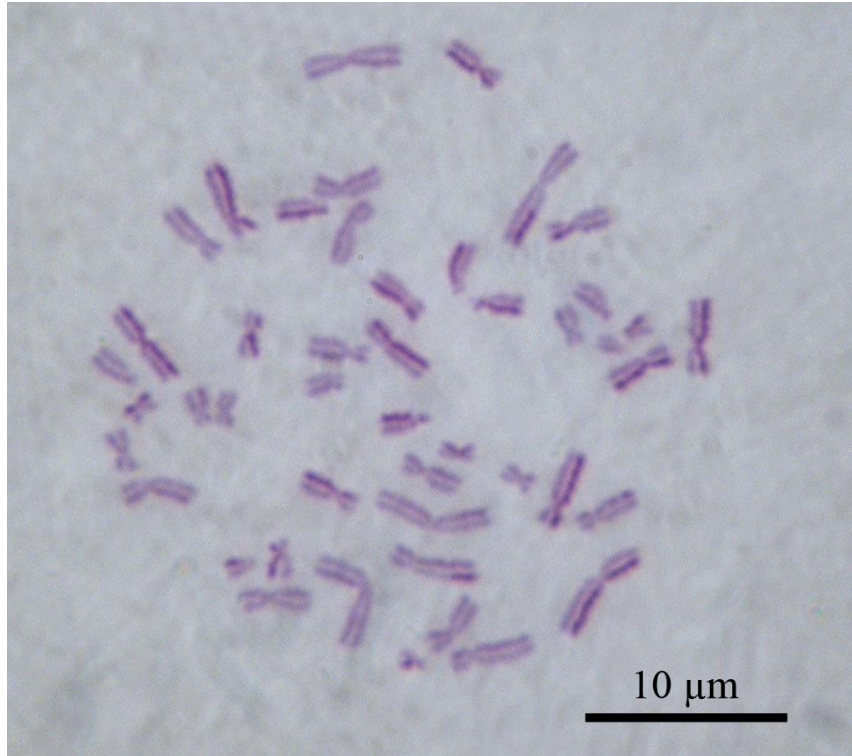
Her bir konsantrasyon ve kontrol gruplarının değerlendirilmesi için KKD içeren 25 adet iyi dağılmış 2. mitoz metafaz plağı değerlendirmeye alınmıştır. Pİ için her konsantrasyon ve kontrol grupları için rastgele 100 metafaz plağı içerisindeki 1. mitoz, 2. mitoz ve 3. mitoz oranları incelenmiştir. Bu metafaz plaklarına ait resimler Resim 4.5, Resim 4.6 ve Resim 4.7'de verilmiştir. Elde edilen veriler spontan ve negatif kontrol verileri ile birlikte student-t testi ile istatistiksel anlamda değerlendirilerek her bir test maddesi için ayrı çizelgelerde verilmiştir.



Resim 4.5 Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (x 1000)



Resim 4.6 İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (x 1000)



Resim 4.7 Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (x 1000)

Chlorthiophos için 4 ayrı kişiden elde edilen insan lenfosit kültüründe her bir kişi için dört farklı konsantrasyon ve 24 ve 48 saat olmak üzere iki uygulama süresi kullanılmış olup dört kişide gözlenen total ortalama KKD/hücre ve Pİ değerleri oluşturulmuş ve bu veriler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferik kan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve proliferasyon indeksi (Pİ) değerler

Test Maddesi	Uygulama		M1	M2	M3	Ortalama Pİ±SS	Ortalama KKD/Hücre ±SS
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)					
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	24	-	130	116	154	2,06±0,32	2,78±0,2c ₂
		9 µl	174	108	118	1,86±0,37	2,65±0,2c ₂
		0,25	207	99	94	1,71±0,2	7,89±1,9a ₂ b ₂
		25	214	80	106	1,79±0,12	3,69±0,8c ₁
		50	201	91	108	1,76±0,15	3,06±0,6c ₁
		100	190	100	111	1,8±0,21	2,7±0,1c ₂
		200	213	94	93	1,8±0,12	2,44±0,2c ₁
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	48	-	192	90	118	1,81±0,08c ₃	2,82±0,16c ₃
		9 µl	217	73	111	1,74±0,1c ₃	2,7±0,21c ₃
		0,25	319	47	34	1,21±0,13b ₂ a ₃	11,25±1,07a ₃
		25	188	91	121	1,83±0,06c ₃	2,52±0,35c ₃
		50	189	76	134	1,85±0,15c ₃	2,59±0,17c ₃
		100	179	89	132	1,88±0,1c ₃	2,74±0,07c ₃
		200	239	58	103	1,66±0,08a ₁ c ₃	2,81±0,06c ₃

a: Kontrol ile; b: Negatif Kontrol (DMSO) ile; c: Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark önemlidir. 1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001

Chlorthiophos’un 24 saatlik uygulama süresinde ilk iki konsantrasyonda (25 ve 50 µg/ml) kontrol grubuna göre, buna ek olarak 100 µg/ml’lik konsantrasyonda dâhil olmak üzere ilk üç konsantrasyonda ise negatif kontrol grubuna göre KKD frekansını aşan değerlere rastlanmıştır. 200 µg/ml’lik konsantrasyonda ise hem kontrole hem de negatif kontrole göre bir azalış söz konusudur. Ancak bu değerler doza bağlı bir artış göstermemekle beraber istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmamıştır. 48 saatlik uygulama süresinde ise KKD frekansı kontrole göre tüm konsantrasyonlarda, negatif kontrole göre ise 25 ve 50 µg/ml’lik dozlarda düşükken son iki dozda (100 ve 200 µg/ml) artış göstermiştir. Bu uygulama saatinde en yüksek değer 200 µg/ml’lik konsantrasyonda gözlenmiştir. Ancak her iki uygulama süresinde de tüm değerler pozitif kontrole göre önemli derecede düşük çıkmıştır. Tüm konsantrasyonlar pozitif

kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı iken kontrol ve negatif kontrole göre herhangi bir anlam ilişkisi saptanmamıştır. Test bileşiklerinin tam kan kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu KKD değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

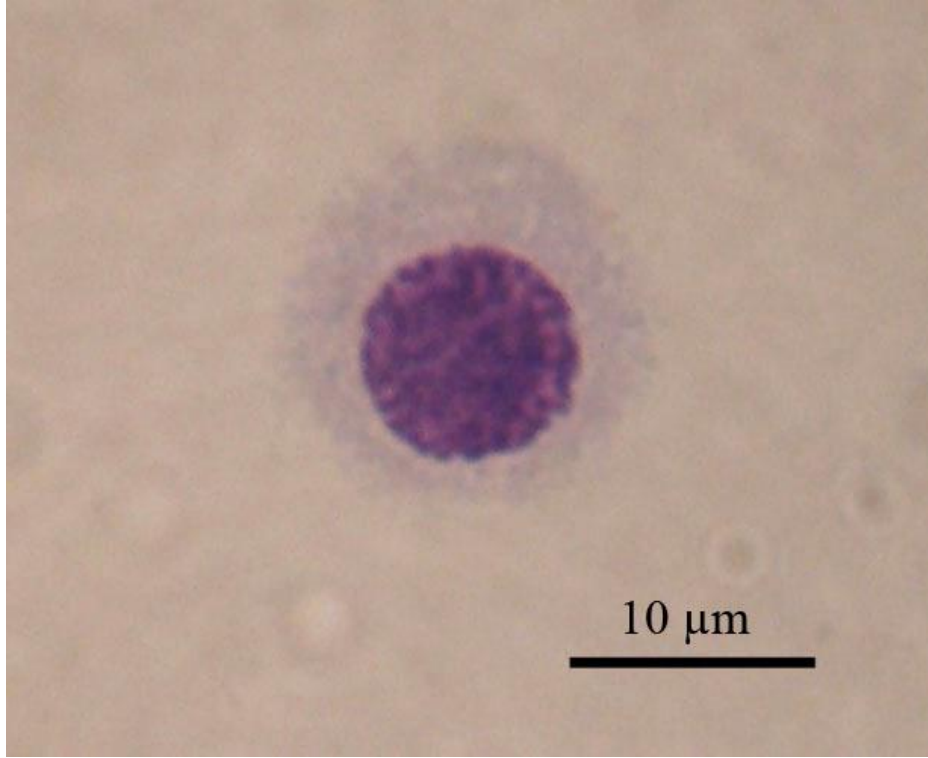
Chlorthiophos’un 24 saat uygulamada tüm konsantrasyonları ve 48 saat uygulamada 200 µg/ml konsantrasyonlarının Pİ’yi negatif kontrole göre düşürdüğü görülmektedir. Ancak bu düşüş sadece 48 saatlik uygulama süresinin 200 µg/ml’lik konsantrasyonunda kontrole göre istatistiksel olarak bir anlam ifade ederken diğer konsantrasyonlar hem kontrol hem de negatif kontrole göre anlamlı bulunmamıştır. KKD/hücre ile Pİ arasındaki ilişki 24 saat uygulama süresinde anlamlı olmamasına rağmen 48 saatlik uygulama süresinde ortalama KKD/hücre ile Pİ arasında anlamlıdır (Lineer regresyon analizi $R^2=0,843$; Pearson korelasyon $p\leq 0,001$).

Pİ, Chlorthiophos’un DNA replikasyonu üzerine etkisini, Mİ ise mitoz bölünme üzerine etkisini göstermektedir. KA test yönteminden elde edilen Mİ ve KKD test yönteminden elde edilen Pİ arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak Mİ ve Pİ indeksleri azalmaktadır. Pİ ve Mİ arasındaki ilişki 24 saat uygulamada anlamlı olmamasına rağmen 48 saat uygulamada aralarındaki ilişki anlamlıdır (Lineer regresyon analizi $R^2= 0,442$; Pearson korelasyon $p=0,05$).

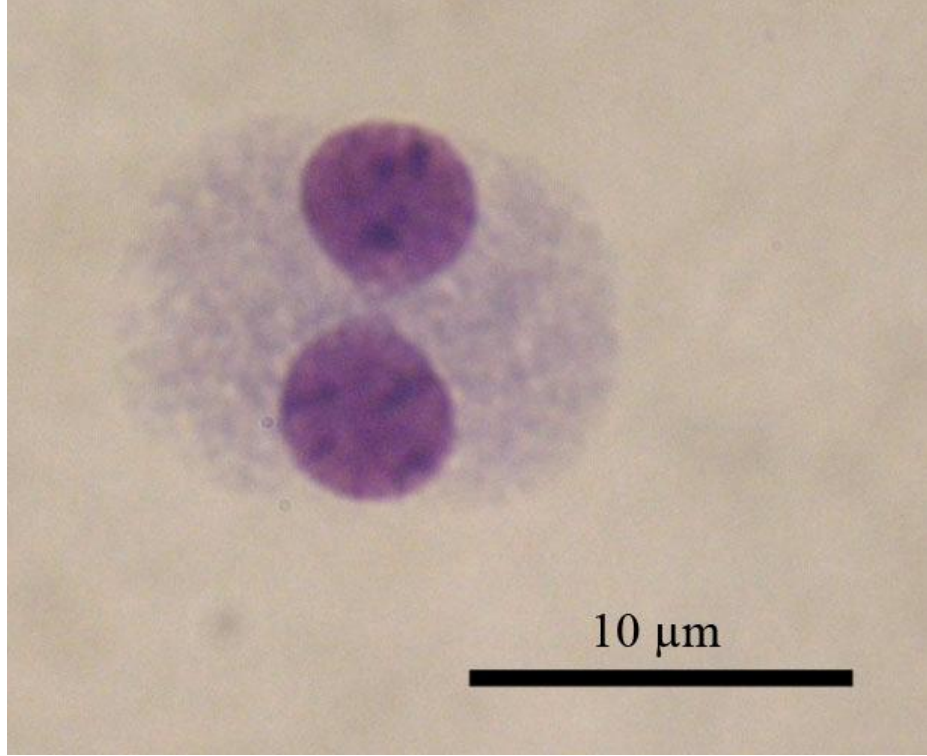
4.2.2 Chlorthiophos’un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

İnsan lenfosit kültürlerinin Chlorthiophos’un farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama süresi sonucunda dört kişide gözlenen total MN sayısı, %BNMN değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. Bunun yanı sıra iki nükleuslu hücrelerde mikronükleus dağılımı, sitotoksosite indeksleri olarak sitokinezi-blok proliferasyon indeksi (CBPI) ve

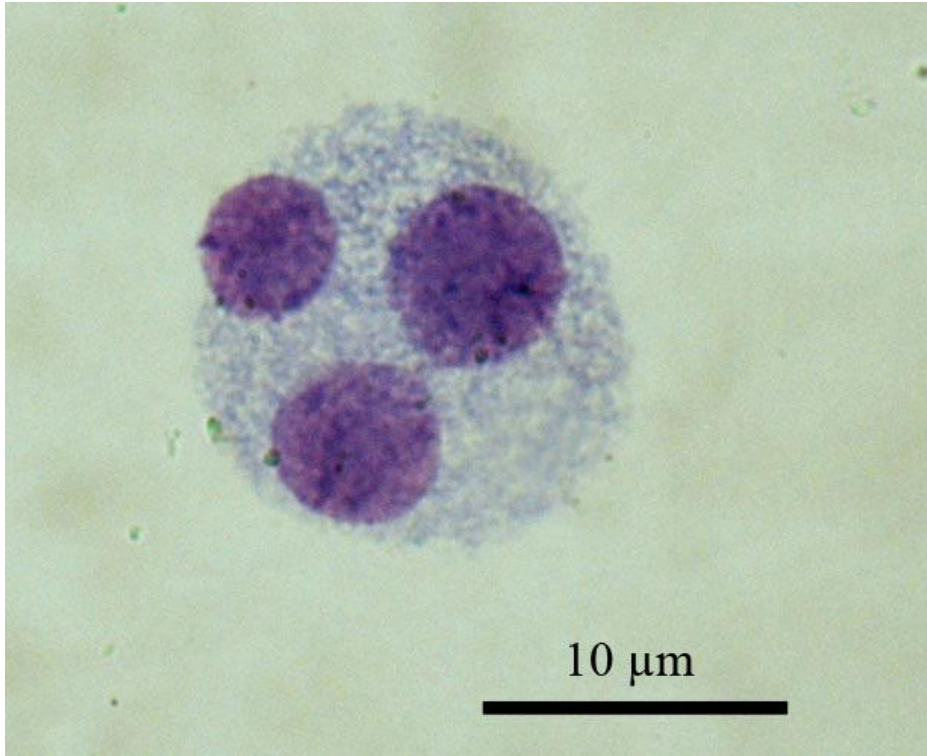
iki nükleuslu hücre frekansı (%BN) da gösterilmiştir. Sitokinezi-blok proliferasyon indeksini belirlemek amacıyla bir, iki ve multinükleuslu 2000 (dört kişi için toplam 8000 hücre) hücre sayılmıştır. Bunlara ait resimler Resim 4.8, Resim 4.9, Resim 4.10 ve Resim 4.11’de verilmiştir. İki nükleuslu hücrelerde mikronükleus içeren görüntüler ise Resim 4.12, Resim 4.13 ve Resim 4.14’de gösterilmiştir. MN test yönteminde mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin (BNMN) % oranları analiz edilerek genotoksisite değerlendirmesi yapılmıştır. Her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için 2000 iki nükleuslu hücre sayılarak negatif kontrole göre anlamlılığı test edilmiştir. Chlorthiophos’un mikronükleus testine ait verilerinin tümü  izelge 4.3’de verilmiştir.



Resim 4.8 Bir nükleuslu hücre (x 400)



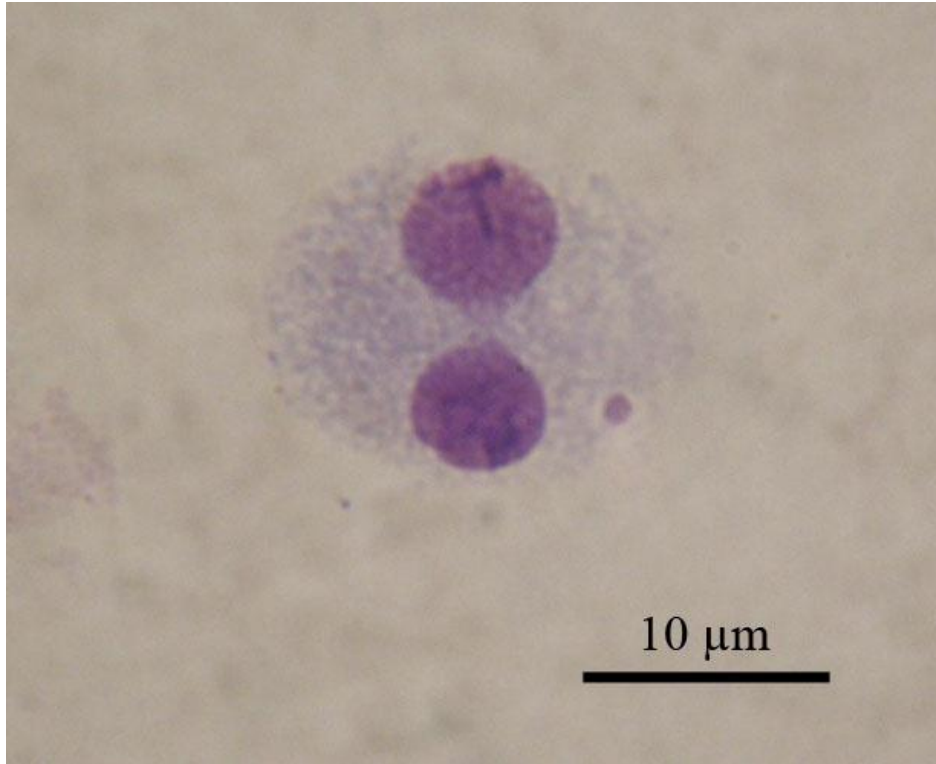
Resim 4.9 İki nükleuslu hücre (x 400)



Resim 4.10 Üç nükleuslu hücre (x 400)



Resim 4.11 Dört nükleuslu hücre (x 400)

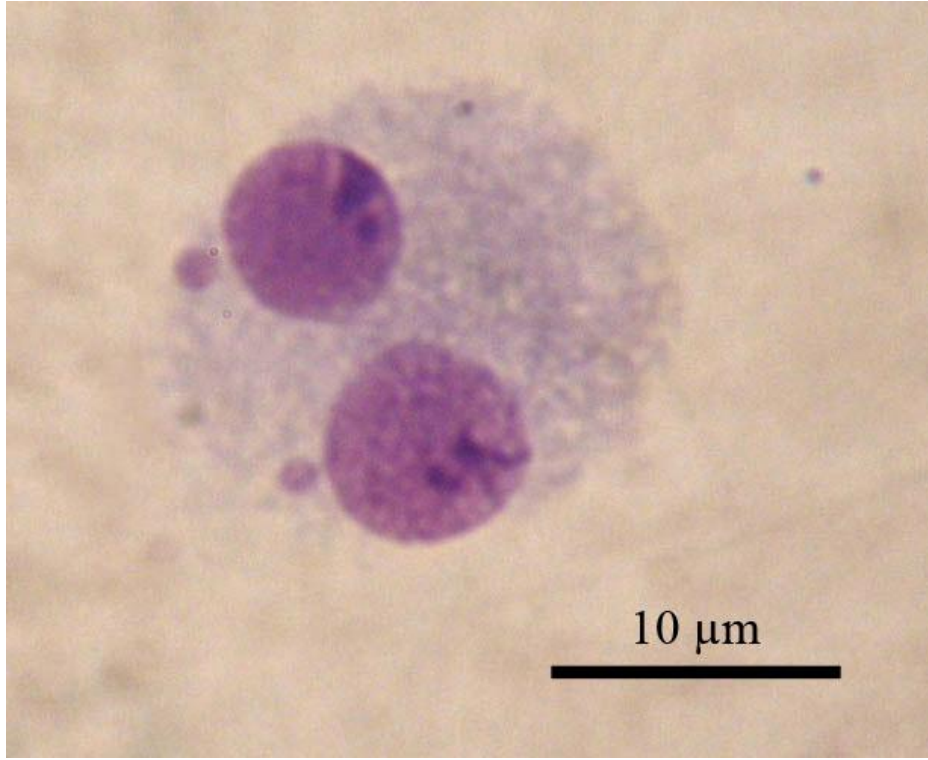


Resim 4.12 Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (x 400)

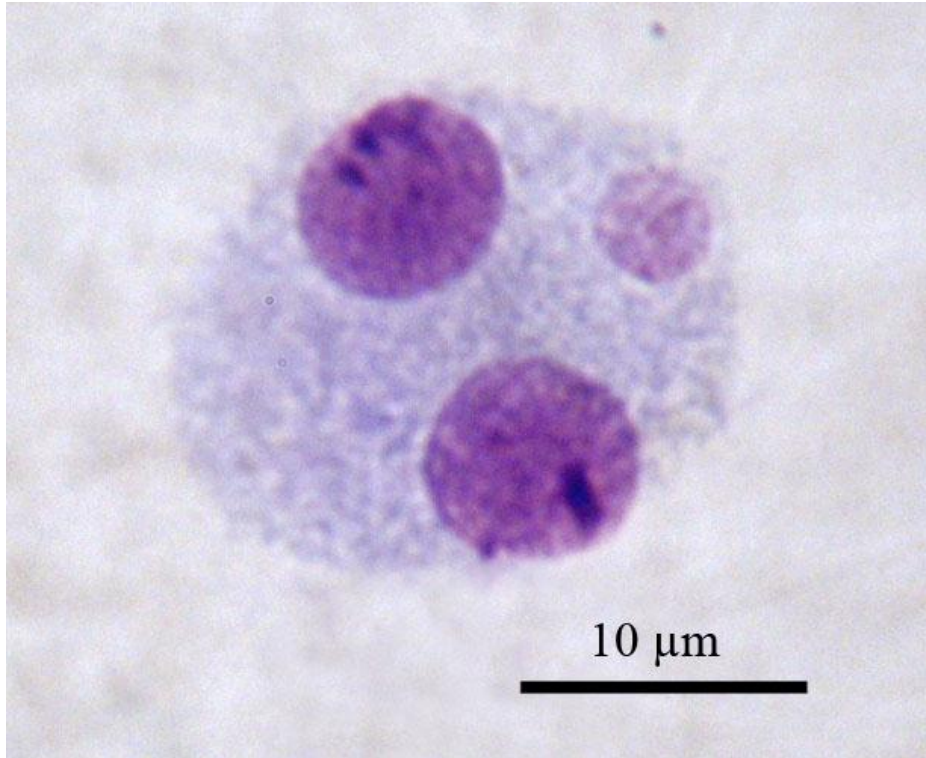
Çizelge 4.3 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen MN, BNMN ve CBPİ değerleri

Test Maddesi	Uygulama		BN Hücrelerde MN Dağılımı								Nükleus sayısına göre Hücrelerin dağılımı						CBPİ±SS
	Süre (saat)	Doz. (µg/ml)	0	1	2	3	4	> 4	Toplam MN	BNMN %±SS	1	2	3	4	>4	BN %	
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	24	-	7987	13	-	-	-	-	13	0,16±0,06c ₃	1677	4806	745	764	8	60,07	2,07±0,01c ₁
		9 µl	7982	18	-	-	-	-	18	0,22±0,18c ₃	1459	5458	475	600	8	68,22	2,02±0,11 c ₁
		0,20	7708	288	4	-	-	-	292	3,65±0,95a ₃ b ₃	3038	4800	96	66	-	60	1,64±0,24 a ₁ b ₁
		25	7973	26	1	-	-	-	27	0,33±0,14c ₃	1999	5211	338	446	6	65,13	1,90±0,15
		50	7971	24	5	-	-	-	29	0,36±0,16c ₃	2243	4879	439	436	3	60,98	1,88±0,18
		100	7957	40	3	-	-	-	43	0,53±0,1a ₃ c ₃	2590	4836	251	322	1	6045	1,78±0,15 a ₂ b ₁
		200	7935	61	4	-	-	-	65	0,81±0,13a ₃ b ₁ c ₃	4245	3607	66	8	2	45,08	1,5±0,16 a ₃ b ₂
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	48	-	7985	15	-	-	-	-	15	0,18±0,06c ₃	1804	4911	671	606	8	61,38	2,01±0,04 c ₃
		9 µl	7981	19	-	-	-	-	19	0,23±0,12c ₃	2086	5207	315	390	2	65,08	1,87±0,13 c ₃
		0,20	7671	318	11	-	-	-	329	4,11±0,44a ₃ b ₃	6105	1768	89	37	1	22,1	1,23±0,12 a ₃ b ₃
		25	7978	22	-	-	-	-	22	0,27±0,09c ₃	1208	5944	333	534	1	74,3	2,02±0,1 c ₃
		50	7974	24	2	-	-	-	26	0,32±0,17c ₃	1642	5703	249	406	-	71,28	1,92±0,09 c ₃
		100	7959	40	1	-	-	-	41	0,51±0,19a ₃ c ₃	2179	5333	174	313	1	66,66	1,82±0,16 c ₃
		200	7934	62	4	-	-	-	66	0,82±0,24a ₃ b ₁ c ₃	4092	3721	62	124	1	46,51	1,52±0,15 a ₃ b ₂ c ₂

a: Kontrol ile; b: Negatif Kontrol (DMSO) ile; c: Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark önemlidir 1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001



Resim 4.13 İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (x 400)



Resim 4.14 Büyük bir mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (x 400)

Elde edilen total verilere göre, MN sayısında 24 ve 48 saat uygulama sürelerinin her ikisinde de kontrol ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında doza bağlı olarak bir artış görülmektedir. %BNMN’de ise 24 ve 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda doza bağlı olarak bir artış gözlenmekle beraber hem 24 saat hem de 48 saat uygulamaların her ikisinde de sadece 200 µg/ml konsantrasyonu negatif kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı BNMN oluşumuna yol açmıştır. Ayrıca her iki uygulama süresinde de konsantrasyonlar ve %BNMN arasındaki doz-cevap ilişkisi Lineer regresyon analizi ve Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde aralarındaki ilişki anlamlı olarak saptanmıştır (24 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%68,2$; Pearson korelasyon $p=0,004$; 48 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%62,9$; Pearson korelasyon $p=0,009$).

MN test yönteminde Chlorthiophos’un 24 saatlik uygulama süresindeki konsantrasyonlarının tümünün CBPI’yi düşürdüğü görülmektedir. Buna ek olarak bu uygulama süresinin 200 µg/ml’lik dozundaki değer pozitif kontrolden bile düşük bulunmuştur. 48 saatlik uygulamada ise 25 ve 50 µg/ml’lik konsantrasyonlarda negatif kontrol grubunu aşan değerler kaydedilmiş olup bu değerler kontrole göre çok yüksek değerler değildir. 100 ve 200 µg/ml’lik konsantrasyonlarda ise kontrole göre düşüş görülmektedir. 24 saatlik uygulama süresinin son iki konsantrasyonu (100 ve 200 µg/ml) hem kontrol hem de negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken 48 saatlik uygulama süresinin sadece son konsantrasyonu (200µg/ml) her iki kontrole göre de anlamlı çıkmıştır. Ayrıca bu dozların tümünün pozitif kontrole göre oldukça yüksek bulunduğu gözlenmiştir.

4.2.3 Chlorthiophos’un Kromozom Aberasyonlarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Chlorthiophos’un farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama süresi sonucunda insan lenfosit kültüründe dört kişide gözlenen total KA’ları ve Mİ değerleri Çizelge

4.4’de verilmiştir. Çizelgede; kişilerde gözlenen kromozom aberasyonlarından başka hücre başına düşen kromozom aberasyon sayısı ve anormal hücre yüzdesi de gösterilmiştir. KA test yönteminde, deneysel birim hücredir. Dolayısı ile anormallik taşıyan hücrelerin yüzde oranları hesaplanarak test edilen kimyasalın klastojenitesi değerlendirilmiştir. Her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için 100 metafaz sayılmıştır.

İnsan periferik lenfositlerinde bu madde kromatid değişimi (Resim 4.15), kromatid kırığı (Resim 4.16), kromozom kırığı (Resim 4.17), fragment (Resim 4.18), disentrik kromozom (Resim 4.19) ve poliploidi (Resim 4.20) gibi kromozom anormalliklerine neden olmuştur.

Hücre başına düşen toplam KA verilerine bakıldığında 24 saatlik uygulamada hem kontrole hem de negatif kontrole göre bir artış gözlenmiştir. Bu değerlerin tümü hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulama süreleri için istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bulunmuşken sadece 200 µg/ml’lik konsantrasyon ayrıca negatif kontrole göre de anlamlı çıkmıştır. 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlar kontrole göre düşükken; 25 µg/ml’lik konsantrasyon negatif kontrolden düşük, 50 ve µg/ml’lik konsantrasyonlar aynı değerde ve 200 µg/ml’lik konsantrasyon ise negatif kontrolden fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.4 Değişik dozlarda Chlorthiophos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı, KA/ hücre ve Mİ değerleri

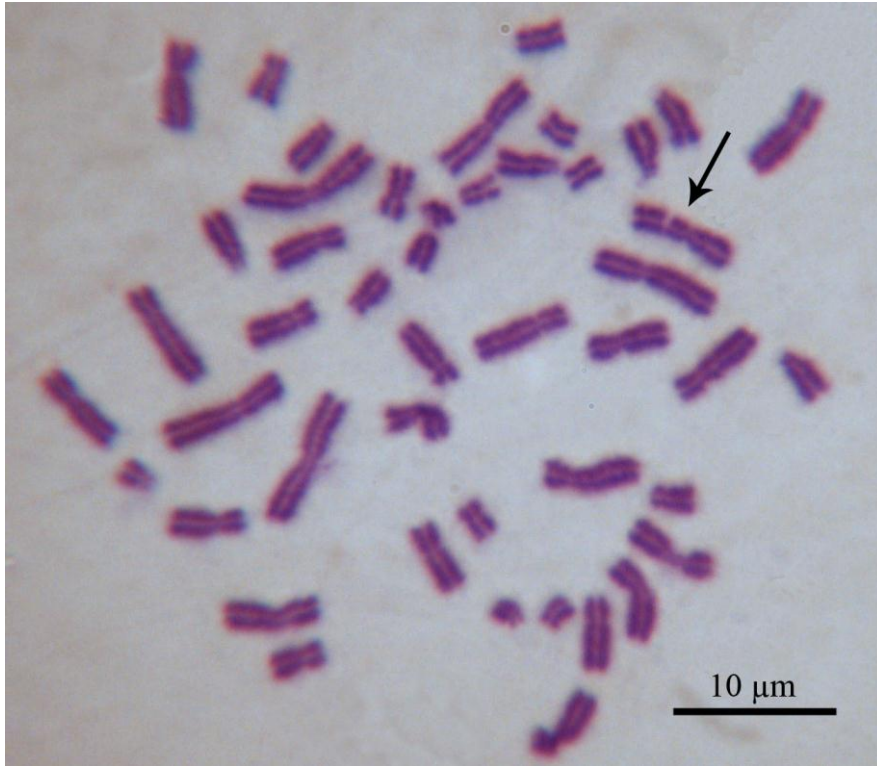
Test Maddesi	Uygulama		KA/Hücre (gap -)	Anormal Hücre±SS	Kromozom Aberasyonları								Mİ±SS
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)			B'	B''	F	KKB	DS	T	KD	P	
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	24	-	0,09±0,01b ₃ c ₃	7±0,8 b ₁ c ₃	5	1	1		1			1	6,53±0,28b ₁ c ₃
		9 µl	0,17±0,02a ₃ c ₃	12,25±3,69a ₁ c ₃	5	4	4				2	2	5,59±0,22a ₁
		0,25	0,46±0,02a ₃ b ₃	53±13,71a ₃ b ₃	28	9	4				5		5,24±0,19a ₃
		25	0,17±0,02a ₃ c ₃	14,5±1,29a ₃ c ₃	5	3	3		1		5		5,54±0,18a ₃
		50	0,17±0,02a ₃ c ₃	17,75±1,71a ₃ c ₂	6	3	2		2		2	2	4,97±0,35a ₃ b ₁
		100	0,18±0,02a ₃ c ₃	18,25±8,5a ₁ c ₂	7	3	3				1	4	4,55±0,36a ₃ b ₂ c ₁
		200	0,30±0,02a ₃ b ₃ c ₃	28,25±3,28a ₁ b ₃ c ₁	16	4	5				5		4,26±0,2a ₃ b ₃ c ₃
Kontrol DMSO MMC Chlorthiophos	48	-	0,06±0,01b ₃ c ₃	8±0,81c ₃	3	1	2						6,58±0,41c ₃
		9 µl	0,15±0,01a ₃	9,5±1,9c ₃	6		8					1	6,2±0,35c ₃
		0,25	0,67±0,02a ₃ b ₃ c ₃	65±6,53a ₃ b ₃	35	14	12		3			3	4,16±0,19a ₃ b ₃
		25	0,1±0,01c ₃	11±0,82a ₂ c ₃	3	2	1				3	1	5,36±0,26a ₂ b ₂ c ₃
		50	0,15±0,01a ₃ c ₃	13±1,63a ₂ b ₁ c ₃	7						6	2	4,96±0,37a ₃ b ₂ c ₂
		100	0,15±0,01a ₃ c ₃	17±0,82a ₃ b ₃ c ₃	8	3	1				1	2	4,75±0,26a ₃ b ₃ c ₁
		200	0,18±0,02a ₃ b ₁ c ₃	23±0,82a ₃ b ₃ c ₃	8	2	2		2		4		4,23±0,2a ₃ b ₃

a. Kontrol ile; b: Negatif Kontrol (DMSO) ile; c: Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark önemlidir. 1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001

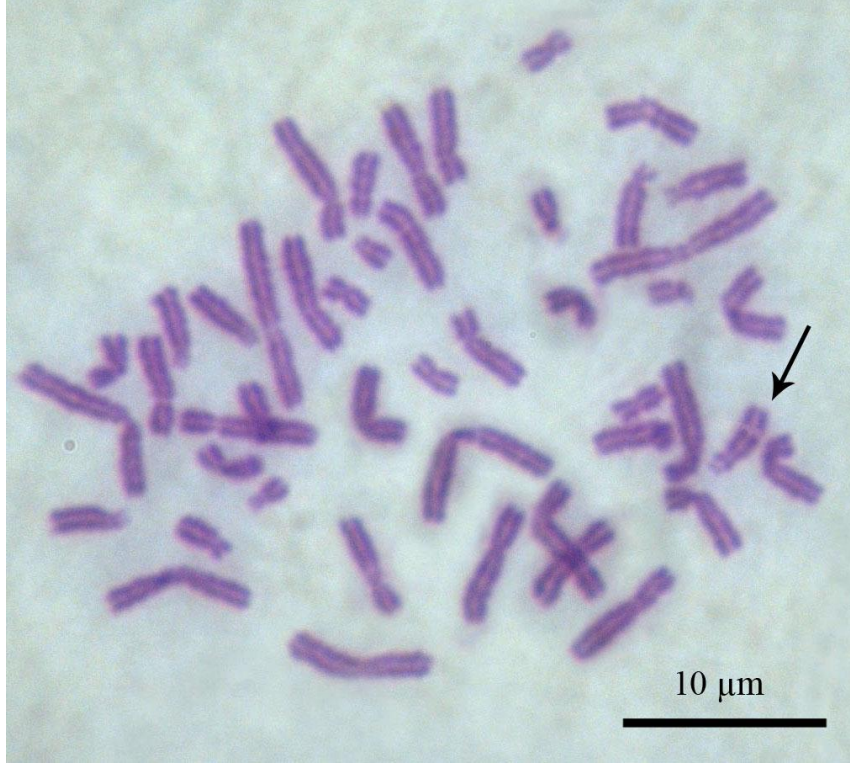
B': Kromatid kırığı; B'': Kromozom kırığı; F: Fragment; KKB: Kardeş Kromatdi Birleşmesi; DS: Disentrik kromozom; T: Translokasyon; KD: Kromatid değişimi; P: Poliploidiyi ifade etmektedir.



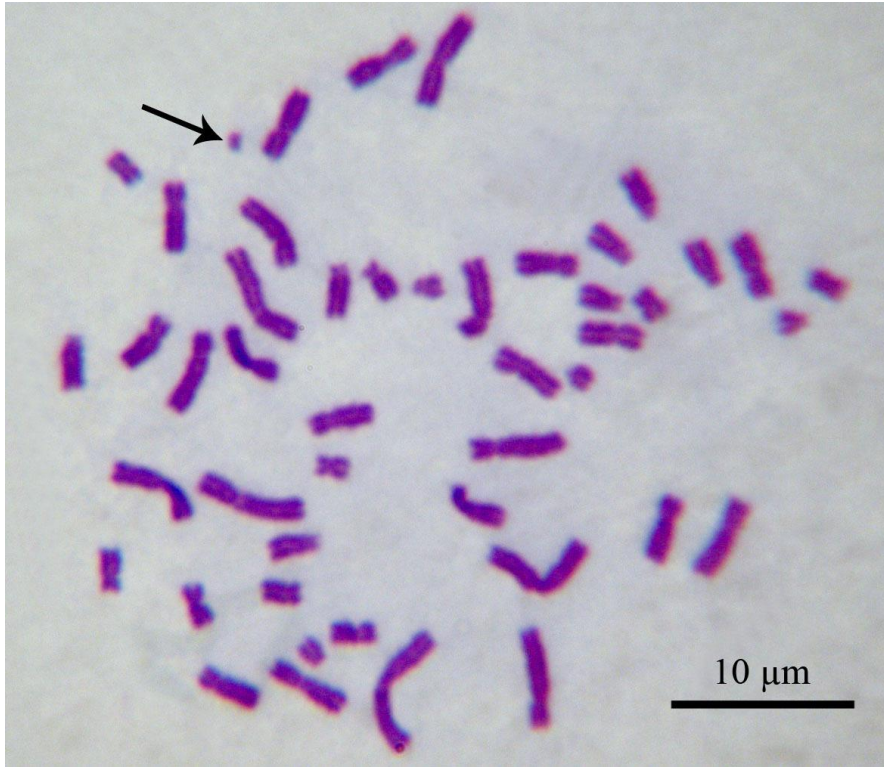
Resim 4.15 Homolog kromozomlar arasındaki kromatid değişimi (okla gösterilen) bulunan metafaz plağı (x 1000)



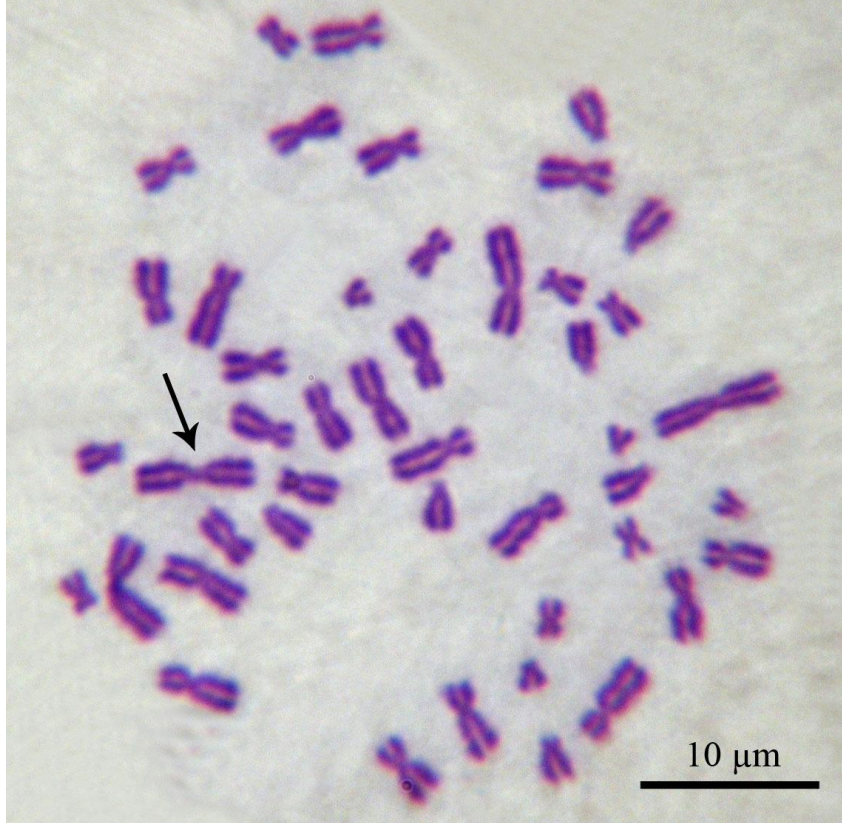
Resim 4.16 Kromatid kırığı (okla gösterilen) bulunan metafaz plağı (x 1000)



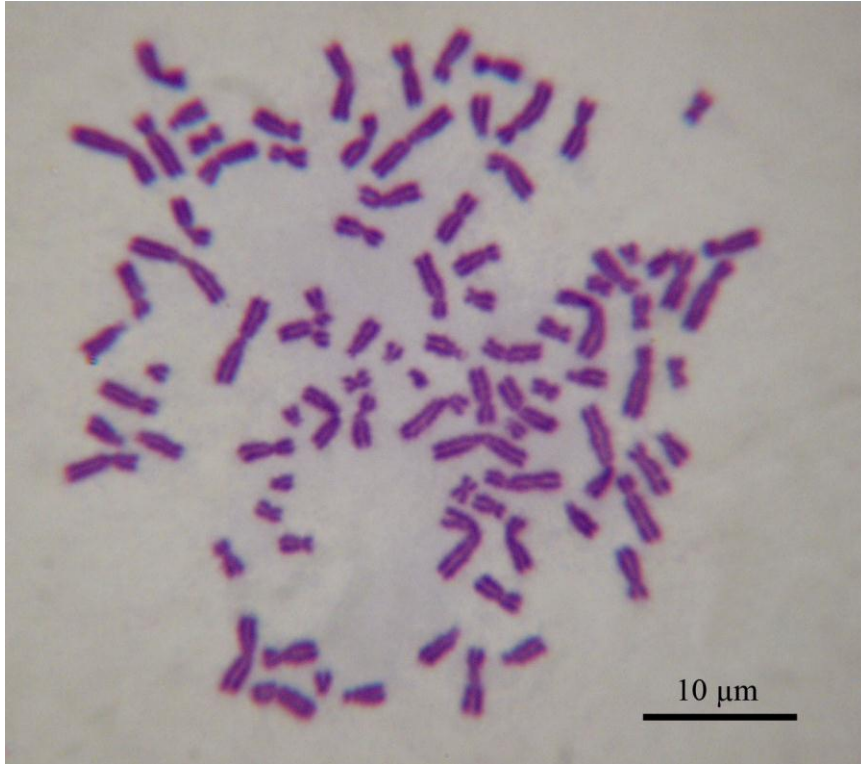
Resim 4.17 Kromozom kırığı (okla gösterilen) bulunan metafaz plağı (x 1000)



Resim 4.18 Fragment (okla gösterilen) bulunan metafaz plağı (x 1000)



Resim 4.19 Disentrik kromozom (okla gösterilen) bulunan metafaz plağı (x 1000)



Resim 4.20 Poliploidi bulunan metafaz plağı (x 1000)

Anormal hücre yüzdesinde ise bu madde için 24 saatlik uygulama süresinde sadece 200 µg/ml’lik konsantrasyonda anlamlı bir artış gözlenirken 48 saatlik uygulama süresinde 50, 100 ve 200 µg/ml’lik konsantrasyonlarda anlamlı bir artış göstermiştir.

KA test yönteminde hücrelerin bölünme oranları toksisite değerlendirilmesinde kullanılan bir kriterdir. Kişilerden elde edilen Mİ değerleri total olarak değerlendirildiğinde 24 saatlik uygulama süresinde Chlorthiophos Mİ’yi doza bağlı olarak düşürmüş ancak bu dozlardan son üçü (50, 100 ve 200 µg/ml) negatif kontrole göre anlamlı olarak bir azalışa sebep olmuştur. Kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde ise tüm değerler anlamlı olarak düşüş göstermiştir. 48 saatlik uygulama süresinde ise hem kontrol hem de negatif kontrole göre tüm veriler anlamlı olarak doza bağlı bir azalış göstermiştir.

Her iki uygulama süresinden elde edilen Mİ değerleri ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile tespit edilmiş, pearson korelasyon testi ile anlamlılığı araştırılmıştır ve aralarında negatif yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır (24 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%80,4$; Pearson korelasyon $p \leq 0,001$; 48 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%83,5$; Pearson korelasyon $p \leq 0,001$).

Bunun yanı sıra KA frekansı ile Mİ arasında da bir anlam ilişkisi söz konusudur. Her iki uygulama süresinde de Mİ düştükçe KA sayısının arttığı görülmektedir. KA/hücre ile Mİ arasındaki ilişki lineer regresyon analizine göre tespit edilmiş, Pearson korelasyon testine göre aralarında anlamlı negatif yönde bir korelasyon saptanmıştır (24 saat için Lineer regresyon analizi $R^2 = \%41,2$ Pearson korelasyon $p = 0,03$; 48 saat için Lineer regresyon analizi $R^2 = \%56,2$ Pearson korelasyon $p = 0,002$). Toksisite arttıkça kromozom aberasyonları da artmaktadır.

4.2.4 Anilofos'un Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri

Anilofos'un farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama sonucunda insan lenfosit kültürlerinde dört kişide gözlenen total ortalama KKD/hücre ve Pİ değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Dört kişinin total verilerine bakıldığında; Anilofos'un 24 saatlik uygulamada KKD frekansında kontrole göre 25 µg/ml'lik konsantrasyon dışındaki dozlarda, negatif kontrole göre ise tüm konsantrasyonlarda doza bağlı bir artış söz konusudur. 48 saatlik uygulama süresinde ise kontrole göre tüm konsantrasyonlarda negatif kontrole göre ise ilk üç konsantrasyonunda kontrole göre bir düşüş gözlenmektedir. Bu uygulama süresinde sadece 200 µg/ml'lik dozda negatif kontrole göre bir artış söz konusudur. Ancak genel olarak bakıldığında 48 saatlik uygulama süresinde tüm dozlarda kontrole yakın değerler kaydedilmiştir. Dolayısıyla bu dozlar hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulama sürelerinde negatif kontrol grubuna kıyasla ortalama KKD/hücre sayısında belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır. Tüm süre ve konsantrasyonlarda KKD pozitif kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Tüm konsantrasyonlar pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı iken kontrole göre 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlar anlamlı bulunmuş ancak negatif kontrole göre konsantrasyonların hiçbiri anlamlı olarak saptanmamıştır.

Anilofos'un 24 saatlik uygulama süresinde tüm dozlarda Pİ'yi kontrole ve negatif kontrole göre düşürdüğü görülmektedir. 48 saatlik uygulama süresinde ise 200 µg/ml'lik konsantrasyonda kontrole ve negatif kontrole göre bir düşüş gözlenirken diğer dozlarda kontrole yakın değerler kaydedilmiştir. Tüm bu düşüşler ise istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir.

Çizelge 4.5 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve proliferasyon indeksi (Pİ) değerleri

Test Maddesi	Uygulama		M1	M2	M3	Ortalama Pİ±SS	Ortalama KKD/Hücre ±SS
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)					
Kontrol	24	-	255	75	74	1,58±0,1c ₃	3,38±0,68c ₃
DMSO		9 µl	286	63	51	1,41±0,15c ₃	3,08±0,68 c ₃
MMC		0,25	312	40	48	1,33±0,08a ₂	9,39±0,89a ₃ b ₃
Anilofos		25	310	41	49	1,34±0,07a ₂	3,12±0,51c ₃
		50	295	58	47	1,37±0,1a ₁ c ₃	3,42±0,41c ₃
		100	264	70	36	1,35±0,07a ₂ c ₃	3,54±0,23c ₃
		200	309	59	34	1,32±0,04a ₁ c ₃	3,93±0,66c ₃
Kontrol	48	-	277	64	59	1,45±0,21c ₃	3,36±0,41c ₃
DMSO		9 µl	267	53	80	1,53±0,27c ₃	3,03±0,24c ₃
MMC		0,25	331	35	34	1,25±0,06	11,34±1,35a ₃
Anilofos		25	249	68	83	1,58±0,04c ₃	2,62±0,17a ₁ c ₃
		50	247	66	87	1,55±0,03c ₃	2,67±0,28a ₁ c ₃
		100	256	59	85	1,57±0,07c ₃	2,77±0,37c ₃
		200	307	36	57	1,37±0,04c ₃	3,23±0,28c ₃

a: Kontrol ile; b: Negatif Kontrol (DMSO) ile; c: Pozitif Kontrol (MMC) ile arasındaki fark önemlidir

1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001

Lineer regresyon analizi ve pearson korelasyon testine göre 24 saatlik uygulamada KKD/hücre ile Pİ arasındaki ilişki anlamlı bulunmamasına rağmen 48 saatlik uygulamada pearson korelasyon testine göre aralarında anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır (48 saat için Lineer regresyon analizi $R^2=53,6$, Pearson korelasyon $p=0,003$).

Pİ ve KA test yönteminden elde edilen Mİ değerleri arasında da 24 saat uygulama süresinde pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptanmışken (Lineer regresyon analizi $R^2=50,7\%$; Pearson korelasyon $p=0,006$) 48 saatlik uygulama süresinde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

4.2.5 Anilofos'un Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Elde edilen total verilere göre, MN sayısında 24 saatlik uygulama süresinde artış gözlenirken 48 saatlik uygulama süresinde ilk konsantrasyonda (25 µg/ml) negatif kontrole göre bir artış diğer üç konsantrasyonda (50, 100 ve 200 µg/ml) ise hafif bir düşüş söz konusudur. Ancak bu üç konsantrasyondaki değerler negatif kontrole yakın değerlerdir. %BNMN'sinde ise 24 saatlik uygulamada her iki kontrole göre de artış gözlenirken 48 saatlik uygulama süresinde ilk konsantrasyonda negatif kontrole göre bir artış diğer üç dozda ise (50, 100 ve 200 µg/ml) bir azalış söz konusudur. 48 saat uygulama süresinin değerlerinin tümü kontrole göre düşüş göstermiştir. Tüm veriler dikkate alındığında bu değerlerin tümü pozitif kontrole göre oldukça düşük bulunmuş olup sadece pozitif kontrol ile istatistiksel açıdan bir anlam ilişkisi bulunmaktadır. Ayrıca her iki uygulama süresinde de konsantrasyonlar ve %BNMN arasındaki doz-cevap ilişkisi lineer regresyon analizi ve pearson korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde aralarında herhangi bir anlamlı ilişki saptanmamıştır. İnsan lenfosit kültürlerinin Anilofos'un farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama sonucu dört kişide gözlenen total MN sayısı, %BNMN değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen MN, BNMN ve CBPİ değerleri

Test Maddesi	Uygulama		BN Hücrelerde MN Dağılımı								Nükleus sayısına göre Hücrelerin dağılımı						CBPİ±SS
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	0	1	2	3	4	>4	Toplam MN	BNMN %±SS	1	2	3	4	>4	BN %	
Kontrol DMSO MMC Anilofos	24	-	7960	40	-	-	-	-	40	0,5±0,15c ₃	3003	4100	382	503	12	51.25	1,8±0,31
		9 µl	7953	41	3	3	-	-	47	0,58±0,21c ₃	3347	3921	262	462	8	49.01	1,73±0,14
		0,20	7723	260	12	5	-	-	277	3,46±0,2a ₃ b ₃	4013	3896	53	37	1	48.7	1,51±0,13c ₁
		25	7948	48	-	4	-	-	52	0,65±0,21c ₃	2742	4649	231	378	-	58.11	1,75±0,47
		50	7952	40	8	-	-	-	48	0,65±0,19c ₃	3157	4241	188	414	-	53.01	1,73±0,29
		100	7932	64	3	-	1	-	68	0,65±0,18c ₃	3361	4347	121	166	5	54.33	1,63±0,12
		200	7947	48	3	1	1	-	53	0,66±0,2c ₃	5786	2153	40	20	1	29.91	1,28±0,19a ₁ b ₂
Kontrol DMSO MMC Anilofos	48	-	7921	68	11	-	-	-	79	0,98±0,3c ₃	2511	4398	498	583	10	54.97	1,89±0,21c ₃
		9 µl	7947	42	11	-	-	-	53	0,66±0,18c ₃	2837	4634	175	342	12	57.92	1,75±0,12c ₃
		0,20	7402	525	63	8	2	-	598	7,47±1,21a ₃ b ₃	5879	2076	31	14	-	25.95	1,27±0,19a ₃ b ₃
		25	7942	46	12	-	-	-	58	0,72±0,15c ₃	2888	4658	119	335	-	58.22	1,73±0,13c ₃
		50	7951	49	-	-	-	-	49	0,61±0,14c ₃	3358	4354	117	171	-	54.42	1,63±0,12c ₁
		100	7957	40	3	-	-	-	43	0,53±0,07c ₃	3869	3933	86	111	1	49.16	1,55±0,16a ₁ c ₁
		200	7959	41	1	-	-	-	42	0,52±0,06c ₃	4982	2889	62	65	2	36.11	1,4±0,14a ₂ b ₂

a: Kontrol ile; b: Negatif Kontrol (DMSO) ile; c: Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark önemlidir 1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001

MN test yönteminde Anilofos'un 24 saatlik uygulama süresindeki konsantrasyonlarından sadece 25 µg/ml'lik konsantrasyonda negatif kontrole göre CBPI'yi artırdığı diğer üç konsantrasyonda ise doz arttıkça azaldığı gözlenmektedir. 200 µg/ml'lik doz ise her iki kontrol grubuna göre de istatistiksel açıdan bir anlam ifade etmektedir. 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda kontrole ve negatif kontrole göre bir düşüş söz konusudur.

4.2.6 Anilofos'un Kromozom Aberasyonlarının Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Anilofos'un farklı konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uygulama sonucu insan lenfosit kültüründe dört kişide gözlenen total KA'ları ve Mİ değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Hücre başına düşen toplam KA verilerine bakıldığında 24 saatlik uygulamada 25 ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlar dışında negatif kontrole göre bir artış gözlenmiştir ve son iki konsantrasyon (100 ve 200 µg/ml) ile pozitif kontrol istatistiksel açıdan hem kontrol hem de negatif kontrole göre anlamlı olarak saptanmıştır. 48 saatlik uygulamada ise negatif kontrole göre tüm konsantrasyonlarda bir artış söz konusudur ve bu dozların tümü istatistiksel bakımdan bir anlam ifade etmektedir. Anormal hücre yüzdesinde ise 48 saatlik uygulamanın 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonları dışında iki uygulama süresinde de kontrole göre bir azalış tespit edilmiş olup bu değerlerin hiç biri istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 4.7 Değişik dozlarda Anilofos ile 24 ve 48 saat uygulama süresinde insan periferel kan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallik çeşitleri, anormal hücre oranı, KA/ Hücre ve Mİ değerleri

Test Maddesi	Uygulama		KA/Hücre (gap -)	Anormal Hücre±SS	Kromozom Aberasyonları								Mİ±SS
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)			B'	B''	F	KKB	DS	T	KD	P	
Kontrol DMSO MMC Anilofos	24	-	0,05±0,01b ₁ c ₃	6,5±1,73c ₂	3	1	1						6,78±0,93c ₃
		9 µl	0,07±0,01a ₁ c ₃	12,5±8,89c ₁	3	1	3						6,17±0,68c ₃
		0,25	0,51±0,01a ₃ b ₃	39,5±12,77a ₂ b ₁ c ₂	20	6	14		5		3	3	3,85±0,49a ₂ b ₃
		25	0,06±0,01c ₃	5,13±0,63c ₂	1	1	3		1				5,77±0,39c ₃
		50	0,06±0,01c ₃	6±2,16c ₂	2	1	2		1				5,40±0,59a ₁ c ₂
		100	0,16±0,01a ₃ b ₃ c ₃	9,75±3,20c ₁	3	1	5		1			1	4,43±0,33a ₃ b ₃
		200	0,12±0,01a ₃ b ₃ c ₃	10,63±1,49a ₁ c ₁	8	4	2					2	3,89±0,46a ₃ b ₃
Kontrol DMSO MMC Anilofos	48	-	0,06±0,01c ₃	6,25±1,5c ₃	2	1	2		1				6,75±0,26b ₁ c ₃
		9 µl	0,05±0,01c ₃	7,5±3c ₃	2	1	2						6,31±0,16a ₁ c ₃
		0,25	0,75±0,03a ₃ b ₃	51±6,68a ₃ b ₃	36	18	15		3			3	4,33±0,15a ₃ b ₃
		25	0,07±0,02c ₃	4,5±1,29c ₃	3	1	2		1				5,35±0,17a ₃ b ₃ c ₃
		50	0,08±0,02b ₁ c ₃	4,55±0,84c ₃	2	3	2		1				4,3±0,14a ₃ b ₃
		100	0,15±0,01a ₃ b ₃ c ₃	8,5±3,42c ₃	3	2	5		1				4,06±0,33a ₃ b ₃
		200	0,19±0,02a ₃ b ₃ c ₃	17±3,74a ₁ c ₃	9	5	6		1			1	3,43±0,35a ₃ b ₃ c ₂

a. Kontrol ile; b. Negatif Kontrol (DMSO) ile; c. Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark önemlidir. 1: P≤0,05 2: P≤0,01 3: P≤0,001 B': Kromatid kırığı; B'': Kromozom kırığı; F: Fragment; KKB: Kardeş Kromatid Birleşmesi; DS: Disentrik kromozom; T: Translokasyon; KD: Kromatid değişimi; P: Poliploidiyi ifade etmektedir.

Mİ ise her iki uygulama süresinde de doza bağılı olarak azalış göstermiştir ve 24 saatlik uygulamada son iki konsantrasyon (100 ve 200 µg/ml) istatistiksel açıdan anlamlı olarak saptanmışken 48 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlar için bu anlamlılık söz konusudur.

Her iki uygulama süresinden elde edilen Mİ değerleri ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile tespit edilerek pearson korelasyon testi ile anlamlılığı araştırılmış ve aralarında negatif yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır (24 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%84,3$; Pearson korelasyon $p \leq 0,001$; 48 saat için, Lineer regresyon analizi $R^2 = \%84,8$; Pearson korelasyon $p \leq 0,001$).

Chlorthiophos'da olduğu gibi Anilofosta'da Mİ düşerken KA sayısında bir artış gözlenmiştir. KA/hücre ile Mİ arasındaki ilişki lineer regresyon analizine göre tespit edilmiş, Pearson korelasyon testine göre aralarında anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır (24 saat için Lineer regresyon analizi $R^2 = \%60,9$; Pearson korelasyon $p \leq 0,001$; 48 saat için Lineer regresyon analizi $R^2 = \%37,6$; Pearson korelasyon $p = 0,05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Chlorthiophos ve Anilofos'un Ames Testi Sonuçları

Günlük yaşama önemli ölçüde giren X ışınları, gamma ışınları ve radyasyon kaynaklarının (televizyon, telsiz telefon, radyoaktif atıklar, nükleer silahlar, nükleer santraller vb.) hatalı ya da kötü amaçlarla kullanımının biyolojik sistemlere zarar verdiği kanıtlanmıştır (Vijayalaxami and Tice 1992). Buna karşın birçok araştırmacı mutajen kimyasalların, radyasyondan çok daha zararlı olduğunu savunmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, korunma önlemi almak ve miktarını ölçmek mümkün iken; birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Hatta kimyasal maddenin mutajenik etkisi varsa bile, maruz kalan kişide ve de devam eden nesillerde görülmeyebilir. Ancak resesif bir allelin, nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır. Çok küçük dozları mutasyona neden olabileceği gibi kanserojen de olabilir (Vural 1984, Dökmeci 1994). Diğer taraftan tüm bu çevresel kirleticiler ve kimyasal mutajen kaynaklarının sınırsız oluşu ve sürekli olarak piyasaya sürülmesi, durumu daha da zor bir konuma sokmaktadır.

Kanserojenler genellikle DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofillerdir (Murray and Mayes 1993). Kanserojenезin başlangıç aşaması kimyasallarla nükleik asitlerin karşılaşmasıdır. Kimyasallar diğer hücresel yapılara da bağlanabilir, fakat nükleik asitlerle bağlanması genetik bilgiyi bozması bakımından önemlidir. (Urso and Clarkson 2003).

Kanserojen ve mutajen maddelerin önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmeleridir. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespiti mümkün

değildir. Kimyasal yöntemlerle bu maddelerin tespit edilmesi mümkün olmadığı için, biyolojik yöntem ve indikatör canlıların dokularında kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır (Anonim 1985).

Kanser hastalığının hala yaygın olması ve günümüzde teknolojinin ilerlemesine karşın bu hastalığın ortadan kaldırılamaması, kanserin temelini oluşturan maddelerin belirlenmesi gereğini ortaya koymuştur (Forman and Ames 1991). Dolayısıyla sayıları milyonları bulan ve hala da yeni sentezlenen bu kimyasal maddelerin seri bir şekilde test edilerek mutajenik/kanserojenik etkilerinin saptanması gerekmektedir.

Bu amaçla bu çalışmada tarım sektöründe yaygın bir şekilde kullanılan iki organofosfatlı pestisit olan Chlorthiophos ve Anilofos'un mutajenik ve genotoksik etkileri belirlenmeye çalışılmış olup, çalışma; bakteriyel (Ames testi) ve sitogenetik (kardeş kromatid değişimi, kromozom aberasyon testi, mikronükleus testi) yöntemler olmak üzere dört test yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu test sistemlerinin mutajenite ve genotoksisiteyi belirlemek için kullanılabilirliği ve geçerliliği geçmiş çalışmalarda rapor edilmiştir (Carrano *et al.* 1978, Maron and Ames 1983, Fenech and Morley 1985a, Carrano and Natarajan 1988, Meng and Zheng 1992, Mortelmans and Zeiger 2000, Albertini *et al.* 2000, Reid *et al.* 2006, Konuk *et al.* 2008, Liman *et al.* 2010).

Organik fosforlu pestisitler geniş etki alanları ve doğada hızla biyodegradasyona uğramaları sebebi ile başta gelişmiş ülkelerde olmak üzere tarımda en yaygın olarak kullanılan pestisit gurubunu oluşturmaktadır. Aynı zamanda bahçe ve sera bitkilerinde kullanılmak için piyasada serbestçe satılmakta olup kolayca erişilebilir pestisitlerdendir. Ayrıca, bu pestisitlerden gerek intihar amaçlı gerekse kazara zehirlenme ve ölüm oranları çok fazla olduğundan dolayı mutajenite ve Kanserojenite çalışmalarının odağı durumundadır.

Kimyasal insektisitlerin hepsi nörotoksiktir. Sinir sisteminde sodyum, potasyum, klor iyonlarının membran transportuna karışarak (organik klorlular, piretroidler); spesifik enzimleri inhibe ederek veya sinir uçlarındaki kimyasal nörotransmitterleri etkileyerek (organik fosforlular, karbamatlar) nörotoksik etkilerini gösterirler (Dirican 2007). Organik fosforlu pestisitler; fosforik asidin amid veya tiyol türevleridirler (Dirican 2007) ve başlıca toksik etkileri, kolinesteraz enzimini inhibe etmelerine dayanır. Organik fosforlu pestisitler tüm membranlardan kolaylıkla emilirler. Deri, konjuktiva, akciğer ve özellikle de oral yoldan alındıklarında hızla absorbe olurlar. Toksisitenin şiddeti, asetilkolinesterazın inhibisyon derecesine bağlıdır (Klassen *et al.* 2001).

Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerden biri olan Chlorthiophos, karınca ve böceklerin kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Chlorthiophos bulunduğu zaman hızlı bir şekilde vücuda nüfuz ederek vücuda yayılmakta ve etkisini başağrısı, baş dönmesi, görmede bulanıklık, agresifleşme, mide bulantısı, midede kramp, ishal, bitkinlik ve göğüs bölgesinde nefes darlığı şeklinde hemen etkisini göstermeye başlamaktadır. Bunun yanı sıra iştahsızlık, uyku bozukluğu, hafızada zayıflama, fiziksel bozulmalar ve ellerde titreme gibi ileri derecede rahatsızlıklar da görülmektedir (Hayes and Laws 1991).

Anilofos'ta yaygın şekilde kullanılan bir organofosfatlı herbisittir ve genellikle pirinçlerin içindeki yabani ot ve bataklık otlarının kontrolünde etkilidir. Bu maddenin oldukça yaygın kullanımı onun mutajenik ve genotoksik etkisinin belirlenmesini zorunlu kılmıştır. Hazarika ve Sarkar (2001)'ın yaptığı bir çalışmada; ratlara, ağız yoluyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda 28 gün boyunca günde bir defa olmak üzere Anilofos verilmiştir. Bu dozlarda Anilofos ratlarda vücut sıcaklığının düşmesine ve kilo kaybına neden olmuştur, eritrositlerin (%41-67), plazmanın (%36), kanın (%37-64), beyinin (%63-73) ve karaciğerin (%28-48) kolinesteraz aktivitesini inhibe etmiştir. Ayrıca plazma ve karaciğerdeki total protein miktarında azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar, Anilofos'un memelilerde ılımlı bir toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir.

Ames testi, *Salmonella*/mikrozom test sistemi olarak da adlandırılmaktadır (Maron and Ames 1983). Bu test çeşitli kimyasal maddelerin neden olduğu olası gen mutasyonlarının belirlenmesinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Metabolik aktivasyonun varlığında veya yokluğunda herhangi bir bakteri suşundaki pozitif sonuç, bir maddeyi mutajen olarak tanımlamak için yeterlidir (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu analizin temel prensibi, *S. typhimurium* bakterisi, histidin aminoasiti bakımından fakir bir besiyerinde (his^-) çoğaltıldığında His operonundaki geriye dönen mutasyonların (his^+) belirlenmesidir (Singh 2009).

Salmonella/mikrozom testinde bir maddeye mutajen denilebilmesi için histidin prototroflarının sayısının kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının en az iki katı olması ya da iki katından az olduğu durumlarda doza bağlı bir artış göstermesi gerekmektedir (Maron and Ames 1983).

Yapılan ön çalışma sonucunda kullanılan pestisitlerden Chlorthiophos için 10 000 $\mu\text{g/plak}$ ve Anilofos için ise 1000 $\mu\text{g/plak}$ dozları sitotoksik olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla çalışma sırasında bu konsantrasyonların altındaki dozlar kullanılmış olup bu dozların üstündeki konsantrasyonların sitotoksik etki göstermesi kullandığımız maddelerin hücre içerisine girdiğinin göstergesidir.

Ames (1973b)'e göre mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar, TA98 için 20-50 revertant/plak, TA97 ve TA100 için 75-200 revertant/plak ve TA102 için ise 100-300 revertant/plaktır (Ames 1973). Çalışma sonucunda TA97 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda ortalama revertant koloni sayısı $87,5 \pm 4,9$, varlığında ise $115,33 \pm 9,9$ olarak bulunmuştur. TA98 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda ortalama revertant koloni sayısı $32,33 \pm 6,5$, varlığında ise $24,5 \pm 2,7$ olarak bulunmuştur. TA100 suşu için bu değerler sırasıyla $106,5 \pm 4,8$ ve $156,5 \pm 13,4$ olarak, TA102 suşu için ise

313±25,91 ve 342±9,4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgular da bahsedilen değerler arasındadır. Bu da bize kullandığımız suşların genotiplerinin doğruluğunu göstermektedir. Bu değerlerin bu kadar geniş aralıkta yer almaları çeşitli parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Bu parametreler arasında minimal ortamın tipi, glukoz-6-fosfat, β -NADP, fosfat tamponu, glukoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrilerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabiliriz (Boath *et al.* 1980, Belser *et al.* 1981).

Çalışmamızda kullandığımız suşlardan TA97 ve TA98; kodon kayması mutasyonlarının, TA100; baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların ve TA102; ise oksidatif tipi ve ochre tipi mutasyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu tip mutasyonların görülme sıklığının fazla olmasından dolayı bu suşlar tercih edilmiştir.

Chlorthiophos'un mutajenitesini belirlemek üzere yaptığımız Ames testi sonuçlarına göre; bu madde TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan uygulamalar dışında kullanılan tüm suşlarda herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir. Fakat TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda uygulanan beş farklı dozun tümünde de kontrol grubunun iki katını aşan değerlere rastlanmıştır. Dolayısıyla bu da maddenin bu suшта mutajenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca genel olarak kullanılan tüm dozlara bakıldığında, doza bağlı olarak koloni sayısında bir artış gözlenmiştir. Bu artış da, Chlorthiophos'un Mortelmans and Zeiger (2000)'a göre zayıf mutajenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anilofos ile yaptığımız çalışmalarda ise TA97, TA100 ve TA102 suşlarının S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğundaki uygulamalarda, yine kontrol grubunun iki katını

aşan değerler saptanmamış olup bu da bu maddenin bu suşlarda herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir. Ancak bu maddenin TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda uygulanan deneylerde 1000 µg/plak, 100 µg/plak ve 10 µg/plak dozlarında koloni sayısında kontrol grubuna göre iki kata yakın değerler elde edilmiş olup bu üç dozda Anilofos mutajeniktir. Dolayısıyla, bu da Anilofos'un çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabildiğini göstermektedir. Ancak, TA98 suşunun S9 fraksiyonu varlığında yapılan uygulamalar ise, yine diğer üç suşla benzerlik göstermekte olup, bu suşta da herhangi bir mutajeniteye rastlanmamıştır.

Biyotransformasyon sonucu biyolojik olarak aktif olan bir kimyasal, inaktif bir metabolite dönüştürülebildiği gibi, inaktif bir kimyasal madde aktif bir metabolite de dönüştürülebilir (Paolini and Forti 1997). Yaptığımız çalışmada TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenitenin ortaya çıkıpta S9 fraksiyonu varlığında mutajenite görülmemesini yukarıdaki ifadeye bağlayabiliriz. Yani ökaryotlarda bulunan enzimin varlığında test edilen kimyasal maddelerin metabolize olması sırasında mutajenik etkinin ortadan kalktığı düşünülebilir. Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilebilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstraktı bakteriyel sisteme dâhil edilerek testler aynı prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikleri de DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta kanserojenik forma dönüştürmektedir (Haack *et al.* 2001). Bu çalışmada uygulanan pestisitlerin TA98 suşu S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik olup S9 fraksiyonu varlığında ise mutajenitenin ortadan kalkması bu enzimin mutajeniteyi ortadan kaldırdığının bir göstergesi olabilir.

Organik fosforlu bir pestisit olan Dicrotophos ile yapılan bir çalışmada TA98 suşunda yine mutajenik aktivite tespit edilmiş (Wu *et al.* 2010) olup bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Ancak yine bu madde TA97a, TA100, TA102 ve TA1535 suşlarında da mutajenik aktivite göstermiş olup bu sonuç bizim diğer

suşlarımızdan farklılık göstermiştir. Diğer suşlardaki bu mutajenik aktivitenin bizim çalışmamızdan farklı olmasının sebebinin ise bu pestisit yan zincirinde yer alan farklı yapılardan kaynaklandığı söylenebilir.

Aufderheide ve Gressmann (2007), Azinphos metil insektisidi ile yaptıkları bir çalışmada, yine TA98 suşunda mutajenik aktivite tespit etmişlerdir. Bu pestisit TA100 suşunda da mutajeniteye sebep olduğundan, bizim çalışmamızdan bu noktada farklılık göstermektedir. Yine aynı çalışmada Phoxim insektisidi ile yapılan uygulamada ise tamamen farklı bir sonuç elde edilmiş ve bu madde, uygulanan her iki suşta da mutajenik bulunmamıştır. Phoxim'in TA100 suşunun sonuçları da bizim çalışmamızla paralellik göstermesine rağmen TA98 suşu sonuçları örtüşmemektedir.

Bu çalışmaların dışında Ames testi pestisitler için çok yaygın olarak kullanılmış olup genelde organik fosforlu pestisitlerin büyük bir kısmı kullanılan suşlarda mutajenik bulunmuştur (Carere *et al.* 1978, Bilgin 1992, Ilinskaya *et al.* 2004, Coral *et al.* 2009). Bütün bu çalışmalar bizim yaptığımız çalışmada TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermiştir. Bununla birlikte, organik fosforlu pestisitlerle yapılmış olan Ames testi sonuçlarına bakıldığında, genellikle mutajenik aktivitenin gözlenmesine rağmen yapılan bazı çalışmalarda mutajeniteden bahsedilmemiştir. Ruiz ve Marzin (1997), TA1535, TA1537, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile yaptıkları çalışmada organik fosforlu bir pestisit olan Tetrachlorvinphos'un bütün bu suşlarda herhangi bir mutajenik aktiviteye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Tetrachlorvinphos bu suşlara ek olarak *S. typhimurium* TA1538 ile denenmiş olup bu suşta da herhangi bir mutajeniteye rastlanmamıştır (Brooks *et al.* 1982). Fenitrothion *S. typhimurium* TA98, TA1535 ve TA1537 ile hem S9 fraksiyonu varlığında hem de yokluğunda mutajenik bulunmamış sadece TA100 suşunun S9 fraksiyonu varlığında zayıf bir mutajenik aktivite göstermiştir (Hara *et al.* 1989). Bir organik fosforlu insektisit olan Chlorpyrifos'un genetik toksisitesi birçok mutajenite testinin yanı sıra Ames testi ile de incelenmiş ve bu incelemelerin hiçbirinde Chlorpyrifos için genotoksik aktivite göstergesi bulunamamıştır (Gollapudi *et al.* 1995).

Yapılan bir başka çalışmada ise organik fosforlu pestisit grubundan olan Phosphobetaines ve Alpha-aminophosphoryl bileşiklerinin Ames testi ile mutajenik aktiviteleri test edilmiş ve bunlardan Phosphobetaines sitotoksik etki göstermezken Alpha-aminophosphoryl bileşiklerinin mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Ilinskaya *et al.* 2004). Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda elde edilen bu sonuçların birbirinden farklı olmasının nedeninin kullanılan maddelerin kimyasal yapılarından ve kullanılan suşların farklılığından kaynaklandığı söylenebilir.

Bir başka çalışmada ise, Brezilya’da hummaya sebep olan bir sivrisinek olan *Aedes aegypti* için kullanılan organik fosforlu bir pestisit olan Temephos’un Ames testi ile metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz ortamlarda TA97, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile mutajenik aktivitesi araştırılmış ve herhangi bir mutajeniteye rastlanmamıştır (Aiub *et al.* 2002). Organik fosforlu bileşikler; toksik etkilerini kolinesteraz ve psödokolinesteraz enzim inhibisyonu yoluyla gerçekleştirirler. Bu bileşiklerin tiyoesterleri “okso” (P=O) haline dönüştükten sonra inhibitör özellik kazanırlar. Bu nedenle tiyoester (P=S) bağı içeren ilaçların etkin olabilmesi için P=O’ya dönüşmeleri gerekir (Marrs 1993, Klassen *et al.* 2001, Vural 1996). Temephos’ta P=S içeren bir organik fosforlu pestisittir. Dolayısıyla yapılan araştırma sonucunda bu P=S grubunun aktif hale gelmediği ve bunun sonucunda da herhangi bir mutajeniteye sahip olmadığı kanısına varılabilir. Çalışmamızda kullandığımız her iki pestisitte P=S içerikli pestisitlerdendir ve elde ettiğimiz sonuçlar TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğundaki çalışmalarda bu bileşiğin “okso” haline dönüştüğünü ve bu maddelerin bu suшта mutajenik olup çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Organik fosforlu pestisitlerin toksik etkilerini gösterdikleri AchE inhibisyonunda; inhibisyona neden olan maddelerin alınış şekli, temasın süresi, yağdaki çözünürlüğü ve maddenin vücutta hidroliz olma özelliği, kolinesterazın aktif bölgesine bağlanma eğilimi, toksinin doğrudan etki etmesi veya önce metabolize olup aktif hale geçtikten sonra etki etmesi gibi bazı sebepler rol oynarlar (Namba *et al.* 1972, Scharf *et al.* 1992, Vural 1996). Ayrıca test bileşenlerinin bakteri hücre duvarından geçmiş olması direkt

olarak DNA ile etkileşeceğini göstermez. Bileşiğin sitoplazmik konsantrasyonu yüksek olsa dahi, sitoplazmik alanda bakteriyel genomda bulunan özgül bağlanma bölgeleriyle kompleks oluşturmayabilir. Dolayısıyla, kimyasal maddenin DNA ile etkileşimi görülmeyebilir (Kayaalp 1995). Buna bağlı olarak da, çalışılan kimyasalların mutajenik olması ya da herhangi bir mutajenik aktivite göstermemesi yukarıdaki etkenlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Bu çalışma ve yapılan diğer çalışmalar gösteriyor ki, uygulanan maddelerin kimyasal yapısı ve ortaya çıkan biyolojik aktivite arasında önemli bir ilişki vardır. Kimyasal maddelerin yapısında bulunan halkaların; grup sayılarının, niteliğinin, bağlanma konumlarının, pozisyonlarının bu yapı-etki ilişkisindeki yeri oldukça önemlidir (Öztaş 2005).

5.2 Chlorthiophos ve Anilofos'un Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Aberasyonu ve Mikronükleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

KKD analizi, çevresel faktörlerle uyarılmış DNA hasarını belirlemede kullanılan en duyarlı sitolojik metodlardan biridir ve uzun yıllardır KKD sıklığının analizi, mutajenler ve kanserojenlerin belirlenmesinde kabul edilir bir metod olarak uygulanmaktadır (Perry and Evans 1975, Zhang *et al.* 1991, Tucker *et al.* 1993, Albertini *et al.* 2000, Helleday 2003). KKD, DNA replikasyon ürünlerinin homolog bölgeleri arasında DNA kırılması ve yeniden birleşmesi sonucu parça değişiminin sitolojik göstergesidir (Latt *et al.* 1981, Topaktaş ve Rencüzoğulları 1995).

Mutajen ve kanserojenlerin gerek *in vivo* gerekse *in vitro* ortamda DNA'da oluşturacağı zararın analizinde kullanılabilen en yaygın metodlardan birisi KKD'dir (Perry and Evans 1975, Wolf 1977, Jonasson 1986). Alink vd. (2007), KKD frekansını genotoksik maddeleri tanımlamak üzere kullandıklarını bildirmişlerdir. Latt (1974)'ın, mitomycin C'nin KKD frekansında artışlara neden olduğunu göstermesinden sonra günümüze

kadar KKD, genotoksisitenin sensitif bir indikatörü olarak kabul edilmekte ve çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tucker vd. (1993), ökaryotik hücrelerde KKD frekansının, DNA replikasyonu ile etkileşime girerek DNA hasarını indükleyen genotoksik maddelerin etkisi ile arttığını tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıya göre; KKD sıklığı genotoksik etkinin belirtisidir yorumu ya KKD sayısının kontrole göre iki katına çıkması veya herhangi bir dozda istatistiksel anlamda artış olması ($p < 0.05$) temeline dayanmaktadır.

Bu çalışmada insan periferel kan lenfositlerinde Chlorthiophos'un test edilen tüm konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de KKD frekansını artırmamıştır. Anilofos'ta ise 24 saatlik uygulama süresinde kullanılan tüm konsantrasyonlarda KKD frekansında kontrole göre artışlar gözlenmiş olup bu değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 48 saatlik uygulama süresinde sadece 200 µg/ml'lik konsantrasyonda kontrol grubuna göre bir artış kaydedilmiş olup bu uygulama süresinde de herhangi bir anlamlılık söz konusu değildir. Dolayısıyla test ettiğimiz farklı konsantrasyonlardaki Chlorthiophos ve Anilofos KKD frekansında anlamlı bir artışa neden olmadığından dolayı, bu kimyasal maddelerin hücresel DNA replikasyonu ile etkileşime girmediğini ve DNA hasarına neden olmadığını söyleyebiliriz.

Literatürlerde Chlorthiophos ve Anilofos'un insan periferel kan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak yine organik fosforlu pestisitler grubuna giren Paraoxon insektisidi bu çalışmaya paralellik göstermekte olup bu maddenin de KKD frekansını artırmadığı bildirilmiştir (Singh *et al.* 1984). Gomez-Arroya vd. (1987), yaptıkları çalışmada yine organik fosforlu bir pestisit olan Methyl azinfos'u kullanmışlar ve bu madde insan periferel lenfositlerinde KKD'de bir artışa neden olmamıştır. Chen vd. (1982), V79 hamster hücre hattında yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak 6 pestisitte (Amaze, Azinphos-methyl,

Bolstar, Fensulfothion, Monitor ve Namacur) herhangi bir artışa rastlanmamıştır. Ayrıca, Satar vd. (2009), organik fosforlu pestisitlerle zehirlenen 40 hastanın periferik kanında KKD sıklığını araştırmış ve bu hastaların tedavi öncesinde alınmış kan örneklerinde sonrasındakilere göre KKD sıklığında herhangi bir artış olmadığını tespit etmişlerdir. Tüm bu çalışmalar KKD sıklığı bakımından herhangi bir artış göstermemesinden dolayı kullandığımız pestisitlere uygunluk göstermektedir.

Bu çalışmaların dışında KKD testi organik fosforlu pestisitler için çok yaygın olarak kullanılmış olup bu araştırmaların sonucunda KKD frekansının arttığı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; V79 hamster hücre hattında Fenthion ve Oxydemeton-methyl (Chen *et al.* 1982), balık solungaç dokularında Methyl parathion ve Phosphamidon (Das and John 1999), insan fetal fibroblastlarında Malathion (Nicholas *et al.* 1979), Dimethoate ve Omethoate (Dolara *et al.* 1992), Methyl parathion, Dimethoate ve Phoxim (Gomez-Arroyo *et al.* 1987) ve yine insan periferik lenfositlerinde Afugan adlı bir organik fosforlu fungusit (Yüzbaşıoğlu vd. 2006), sığır periferik lenfosit kültüründe Glifosat (Sivikova and Dianovsky (2006), Malathion (Balaji and Sasikala 1993), fare dalak hücrelerinde Gardona ve Dursban (Amer and Aly 1992)'ın KKD frekansında artışlara neden olduğu saptanmıştır. Martínez-Valenzuela vd. (2009), yaptıkları çalışmada ise organik fosforlu pestisite maruz kalmış olan 70 tarım işçisinin periferik kanında KKD sıklığında kontrol grubuna göre artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Bazı organik fosforlu pestisitler, geçirgenliklerini modifiye ederek hücre membranlarından geçebilme kapasitesine sahiptirler ve düşük insektisit konsantrasyonlarında muhtemelen hücre membranının geçirgenliği daha az seçici hale gelmekte ve insektisitler bu şekilde hücre içine penetre olabilmektedirler. İnsektisitler hücre içerisine girdikten sonra ise kolayca dışarı atılamadığından dolayı hücrede birikmekte ve yüksek toksisiteye sahip olabilmektedir (Antunes-Madeira and Madeira 1979). Ayrıca buna ek olarak, yaptığımız çalışmadan farklı olarak KKD frekansında meydana gelen bu farklı değerlendirmelerin organik fosforlu pestisitlerdeki ana kimyasal bileşiğe bağlı grupların konumları ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Pommier vd. (1985), araştırmalarında KKD'nin meydana gelişinde Topoizomeraz II enziminin etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Topoizomeraz II enzimi DNA'ya bağlanarak bir kompleks oluşturur. DNA'ya etki eden maddeler bu kompleksin oluşumunu engellemektedirler. Bazı araştırmacılar kimyasal maddelerin memeli topoizomeraz II enziminin DNA kırılma ve yeniden birleştirme siklusunu bozduğunu, bu maddelerin ya enzimin katalitik etkisini yok ettiklerini veya DNA-enzim arasındaki normal olan geçici ayrılmaları devamlı kılarak DNA'da çift iplik kırıklarına sebep olduklarını (topoizomeraz zehirleri) bildirmişlerdir.

İleri sürülen hipoteze göre, KKD'lerin S fazına bağlı bir olay olması, yeni replike olmuş DNA ipliklerinin DNA ift iplik kırık bölgelerinde değiş tokuşu sonucu oluşmasıdır. Çünkü bu enzim yeni replike olmuş DNA ipliklerini tekrar organize ederken, DNA'da çift iplik kırıkları oluşturur ve bunları tekrar birleştirir. DNA'ya etkili ilaçlar topoizomeraz II kompleksini etkileyerek, kırılan DNA ift ipliğinin tekrar birleşmesini önler. Bu kırıklar kardeş kromatidlerin değiş tokuşuna neden olur (Pommier *et al.* 1985, Burden and Osheroﬀ 1998, Müller and Kasper 2000, Lynch *et al.* 2003). Yaptığımız alışma sonucunda her iki pestisitinde KKD'yi indüklemediği dolayısıyla S fazında replikasyon üzerinde olumsuz bir etkiye sebep olmadığı düşünölebilir.

Pestisitlerin tarımda çok yaygın bir şekilde ve kontrolsüz kullanılması onların genotoksisiteleri hakkında bilgi edinmeyi zorunlu hale getirmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda Chlorthiophos'un mutajenik ve genotoksik aktivitesi hakkında herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Ancak Anilofos ile yapılan birkaç toksisite çalışması mevcuttur. Hazarika ve Sarkar (2001)'ın yaptığı bir çalışmada ratlara ağız yoluyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarda 28 gün boyunca günde bir defa olmak üzere Anilofos uygulanmış olup yapılan çalışma sonucunda oral LD₅₀ değerı 1681 mg/kg olarak saptanmıştır. Uygulanmış olan bu dozlarda Anilofos ratlarda vücut sıcaklığının düşmesine ve kilo kaybına neden olmuştur ve bu sonuçlar da Anilofos'un memelilerde ılımlı bir toksisiteye sahip olduğunu göstermiştir (Hazarika and Sarkar 2001). Bizim

yaptığımız çalışmada ise insan periferik lenfositlerinde LD₅₀ değeri 200 µg/ml olarak kaydedilmiş olup bu değerin canlıdan canlıya değışiklik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Yapılan başka bir çalışmada, Aggarwal vd. (2007), yeraltı sularında bulunan arsenik miktarının Anilofos'un embriyofetal toksisitesini değıştirip değıştirmediğini tespit etmeye çalışmışlardır. Anilofos ve sodyum arsenit; hamile ratlara gebeliğin 6. gününden 15. gününe kadar, hem tek tek hem de kombine şekilde gavaj yolu ile uygulanmıştır. Arsenik verilen dozlar ne annede ne de yavruda hiçbir önemli etki göstermemişken, Anilofos tek başına uygulandığında, annede kilo kaybı, iştahsızlık, yavru vücut ağırlığında azalmalara neden olmuştur. Bu da bize Anilofos'un tek başına ve arsenik ile kombine edildiğinde embriyofetal gelişimde önemli değışikliklere sebep olduğunu kanıtlamaktadır.

Mutajen ve kanserojenlerin genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biri de periferik kan lenfositlerindeki KA frekansının değeriendirilmesidir (Carrano and Natarajan 1988, Anderson 1988). Kromozom anormallikleri, DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin, kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ve yeni yapıya sahip kromozomların meydana gelmesi de, DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabilir (Savage 1993).

KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiğini ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Bonassi *et al.* 2000, Albertini *et al.* 2000, Bonassi *et al.* 2004, 2005). Kromozom aberasyonlarının çeşitli etkenlere (kimyasallara, iyonize ve iyonize olmayan radyasyona vb.) maruz kalma sonucunda oluştuğu pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur. Nitekim

tümör hücreleri üzerinde yapılan detaylı araştırmalar bu hücrelerin yapısal ve sayısal kromozom değişiklikleri içerdiğini göstermiştir (Demiroğlu 2003, Sugai *et al.* 2005).

Bu çalışmada hücre başına düşen toplam KA verilerine bakıldığında; Chlorthiophos'da 24 saatlik uygulamada hem kontrole hem de negatif kontrole göre bir artış gözlenmiştir. Ancak bu artış sadece 200 µg/ml'lik konsantrasyonda %56,6 oranında olup, istatistiksel olarak negatif kontrole göre anlamlı çıkmıştır. 48 saatlik uygulamada ise 25 µg/ml'lik konsantrasyon negatif kontrolden düşük, 50 ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlar aynı değerde ve 200 µg/ml'lik konsantrasyon ise negatif kontrolden fazla (%83,3) bulunmuştur. Dolayısıyla bu işlem süresinde, sadece 200 µg/ml'lik konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur. Her iki uygulama süresinin de özellikle son konsantrasyonlarında %50'den daha fazla artışın olması pestisitlerin kullanılması sırasında dozun ne kadar önemli olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca 24 saat ve 48 saatlik uygulama süreleri karşılaştırıldığında 48 saatlik uygulama süresinin daha fazla aberasyona neden olduğu görülmektedir. Sonuç olarak Chlorthiophos uygulaması sonucu görülen klastojenik etki, konsantrasyona bağlı olduğu gibi uygulama süresine bağlı olarak da değişkenlik göstermektedir.

Anormal hücre yüzdesinde ise Chlorthiophos için 24 saatlik uygulama süresinde negatif kontrole göre sadece 200 µg/ml'lik konsantrasyonda anlamlı bir artış gözlenmişken 48 saatlik uygulama süresinde 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir artış saptanmıştır. Anormal hücre yüzdesindeki artış özellikle 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de hücre başına düşen kromozom anormalliğinde olduğu gibi 200 µg/ml'lik konsantrasyonda daha yüksek bulunmuştur. Grant vd. (1977), anormal hücre yüzdesinde meydana gelen artışın kimyasal maddenin iğ (iplikleri) faaliyetleri üzerine olan etkisi ile ortaya çıktığını vurgulamışlardır. Dolayısıyla bu maddenin yüksek dozlarda kullanılması durumunda iğ ipliklerinde daha fazla miktarda bozulmalar meydana geleceği düşünülürse bu da daha çok yapısal kromozom aberasyonlarına neden olabileceği kanısını akla getirmektedir.

Anilofos ise KA frekansında 24 saatlik uygulama süresinde 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulama süresinde ise tüm konsantrasyonlarda kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış göstermiştir. Dolayısıyla Anilofos Chlorthiophos'a göre KA frekansını daha fazla artırmıştır ve bu artışlar kromozom sayı değişikliklerinden daha çok kromozom yapı değişiklikleri şeklindedir. Buradan da Anilofos'un klastojenik bir etkiye sebep olabileceğini ve aynı zamanda bu etkinin doza ve süreye bağlı olarak artış gösterdiğini söyleyebiliriz.

Ayrıca çalışmada her iki pestisitte de kromozom anormalliği olarak en çok kromatid kırıklarına rastlanmıştır. Bunun dışında kromozom kırığı, fragment, az sayıda disentrik kromozom ve kromatid değişimi gibi anormallikler de gözlenmiştir. Kromatid kırıkları; her iki pestisit için 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de, en çok 200 µg/ml'lik konsantrasyonda görülmüştür. Bu değer Anilofos'ta 24 saatlik uygulama süresi için %50 oranında, 48 saatlik uygulama süresi için ise %47,3 oranında artışa neden olmuştur. Chlorthiophos'da ise 24 saatlik uygulama süresinde bu oran %53,3 iken 48 saatlik uygulama süresinde %44,4 değerindedir. Bu iki maddenin kromatid kırıklarını arttırması bu maddelerin klastojenik potansiyele sahip olduğu kanısını desteklemektedir. Dolayısıyla Chlorthiophos'un ve Anilofos'un DNA molekülünün şeker fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını kopardığı anlaşılmaktadır. Buna ek olarak bu iki maddenin kromatid kırığını uyarması onların hücre siklusunun G1 ya da S fazında DNA'da tek iplik kırığını uyardıklarını göstermektedir. Ancak bunun yanında az da olsa çift iplik kırıklarına da rastlanmıştır. Çünkü maddelerin uygulanması ile kromozom kırıkları da meydana gelmiştir. Kromozom kırıkları 24 saatlik uygulama süresinde %25 oranında, 48 saatlik uygulama süresinde ise %22,7 oranında artış göstermiştir. Kromozom ve kromatid tipi hasarlar mekanistik olarak birbirlerinden farklıdır. Periferik lenfositlerde kromozom tipi aberasyonlar iyonize radyasyon ve diğer S-bağımsız klastojenler tarafından indüklenirken, kromatid tipi hasarlar kimyasal mutajenler gibi S-bağımlı ajanlar tarafından meydana getirilir (Norppa *et al.* 2006). Sonuç olarak bu çalışmada kromatid tipi kırıklara daha fazla rastlandığından bunun kullandığımız pestisitlerden yani S-bağımlı ajanlar tarafından kaynaklanabileceği akla gelmektedir. Ayrıca bu maddelerin sadece yapısal kromozom anormalliklerine sebep

olduğu, fakat sayısal kromozom anormalliklerini artırmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla sonuçlar her iki maddenin de klastojenik etkisinin olduğunu fakat anöjenik etkisinin olmadığını göstermektedir.

DNA molekülleri, hem interfaz hem de S evrelerinde çok büyük boyutları nedeni ile mutasyonlara neden olan fiziksel ve kimyasal maddelerin açık hedefleridir. Oluşacak olan DNA hasarı sonucunda mikroskopta görülebilen yapısal KA'ları oluşur (Obe *et al.* 2002). Bu aberasyon tipleri mutajen uygulamasının yapıldığı hücre siklusu safhasına ve kullanılan mutajenik maddenin tipine bağlıdır. İyonize ışınlar gibi ajanlar hücre G1 safhasında iken etki ederse kromozom tipi aberasyonlar meydana gelir, eğer hücre G2 safhasında iken etki ederse kromatid tipi aberasyonlar ve iyonize ışınlar, S safhasında iken etki ederse her 2 tip aberasyonlar da meydana gelebilir (Natarajan and Obe 1982). Kromatid tipi aberasyonlar genellikle G1 ya da S fazında olan hücrelerin S-bağımlı ajanlarla muamelesi ve G2 fazında DNA sentezinin ya da onarımının inhibe edilmesi gibi etkenlerden dolayı meydana gelmektedir (Palitti 1998). Yaptığımız çalışmada daha çok kromatid tipi bunun dışında az sayıda da kromozom tipi kırıkların gözlenmesi kullandığımız pestisitlerin S safhasında daha etkili olduklarını açıkça ortaya koymaktadır.

Das ve John (1999), balık solungaç dokularında yaptıkları bir çalışmada bu çalışmaya benzer sonuçlar elde etmiş olup organik fosforlu iki pestisit olan Methyl Parathion ve Phosphamidon'un her ikisi de kromozom aberasyonunu anlamlı bir biçimde artırmıştır. Aynı zamanda Phosphamidon'un genotoksik etkisi *in vivo* olarak farelerde de çalışılmış olup yine aberasyonlarda anlamlı bir artış gözlenmiştir (Behera and Bhunya 1987). Aynı araştırmacılar farklı bir çalışmada fare kemik iliğinde Asataf adlı organik fosforlu pestisitinin de kromozom aberasyon yüzdesinde artışa neden olduğunu saptamışlardır (Behera and Bhunya 1989). Bu çalışma dışında yine birçok araştırmacının yaptığı çalışmalarda da elde ettiğimiz sonuçlara paralel giden sonuçlar mevcuttur. Webster vd. (2002), yaptıkları bir çalışmada organik fosforlu pestisitlere maruz kalmış çiftçilerde kromozom hasarlarını tespit etmeye çalışmışlardır. Yapılan çalışma sonunda çok düşük

seviyelerde organik fosforlu pestisitlere maruz kalmış bireylerin kanında bile kromozom kırıklarında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış saptanmıştır.

Organik fosforlu bir pestisit olan Monocrotophos'un genotoksik potansiyeli tavukta *in vivo* olarak kromozom aberasyon testi ile araştırılmış ve uygulamadan sadece 24 saat sonra kromozom aberasyonlarında anlamlı bir artış gözlenmiştir (Bhunya and Jena 1993). Ayrıca Adhikari ve Grover (2006), rat kemik iliğinde yaptıkları çalışmada Monocrotophos'ta istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemişler ve bu çalışmada kromatid kırıkları, fragment, halka kromozom ve disentrik kromozomlara rastlanmıştır. Bu araştırmacılar Monocrotophos'un yanında yine organik fosforlu bir pestisit olan Benomyl için de aynı sonuçları elde etmişlerdir.

Edifenphos'un genotoksik potansiyeli *in vivo* olarak farelerde kromozom aberasyon testi ile araştırılmış ve yine bu pestisitte de anlamlı artışlar tespit edilmiştir (Jayashree *et al.* 1994). Malathion'un 4 farklı konsantrasyonu (0,02, 0,2, 2 ve 20 µg/ml) 24 ve 48 saat uygulama süreleri şeklinde insan periferik lenfositlerine uygulanmış ve kromozom aberasyonlarında doza bağlı bir artış gözlenmiştir (Balaji and Sasikala 1993). Amer ve Aly (1992), fare dalak hücrelerine uyguladıkları testte ise yine aberasyonlara rastlamışlardır. Tüm bu çalışmalar yaptığımız çalışmaya uygunluk göstermiş olup bu organik fosforlu pestisitlerin aberasyonlara neden olduğundan dolayı, klatojenik olabileceklerini söylemek mümkündür.

Quest vd. (1990), yaptıkları çalışmada ise Methidathion pestisinin kromozom aberasyon testinde artışlara neden olmadığı ve genotoksik bir etki yaratmadığını tespit etmiş olup bu maddenin sonuçları kromozom aberasyonu bakımından yaptığımız çalışmaya uygunluk göstermemiştir. Yine Chlorpyrifos ile rat lenfositlerinde (Gollapudi *et al.* 1995), Glifosat ile sığır lenfositlerinde (Sivikova and Dianovsky 2006) yapılan çalışmalarda da herhangi bir genotoksik aktiviteye rastlanmamıştır. Bu çalışmaların

bazılarında KA frekansında artışlar gözlenirken bir kısmında azalmaların gözlenmesi ya da istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemesi organik fosforlu pestisitlerde maddeyle temasın süresine, dozuna, maddenin doğrudan ya da önce metabolize olup aktif hale geçtikten sonra etki etmesi gibi etkenlerden kaynaklanıyor olabilir.

Seligmann vd. (2003), sitotoksosite derecesinin tespit edilmesinin, uygun preparasyon zamanını ve test konsantrasyonlarını seçmek için gerekli olduğunu ve özellikle sonuçların insanların maruz kalabileceği bileşiklerin risk değerlendirmesi için kullanıldığında önem taşıdığını bildirmişlerdir.

In vitro KA deneylerinde; Mİ, indüklenen hücresel toksisiteyi izlemek için kullanılır. Mİ, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini verir. Azalmış Mİ, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı gösterir (Gökalp Muranlı 2006).

Çalışmamızda 4 kişiden elde edilen veriler Mİ bakımından değerlendirildiğinde, 24 saatlik uygulama süresinde doza bağlı bir azalış söz konusu olup bunlardan 25 µg/ml’lik konsantrasyon dışındaki diğer üç konsantrasyon (50, 100 ve 200 µg/ml) ve 48 saatlik uygulama süresinde ise tüm konsantrasyonlarda Chlorthiophos Mİ’yi anlamlı olarak düşürmüştür. Mİ’deki en düşük değer her iki uygulama süresinde de 200 µg/ml’lik konsantrasyonlarda görülmüş olup bu değerler 24 saat için %76,2 oranında 48 saat için ise %68,2 oranında bulunmuştur. Anilofos ise 48 saatlik uygulama süresinde Chlorthiophos’a benzer değerler göstermiş olup tüm konsantrasyonlarda Mİ’de bir azalma söz konusu iken, 24 saatlik uygulama süresinde son iki konsantrasyonda (100 ve 200 µg/ml) anlamlı düşüşler kaydedilmiştir. Bu değerler Anilofos’un 24 saatlik uygulama süresi için 100 ve 200 µg/ml’lik konsantrasyonlarda sırasıyla %71,7 ve %63 oranında; 48 saatlik uygulama süresi için ise aynı konsantrasyonlar için sırasıyla %64,3 ve %54,3 oranında saptanmıştır. Her iki madde için de 48 saatlik uygulama süresindeki

değerlerin 24 saatlik uygulama süresine göre düşük olduğu gözlenmiş olup bunun da Mİ'nin düşüşüne bağlı olarak bölünmeye giren hücre sayısının azalmasından kaynaklandığı akla gelmektedir.

Mİ, ayrıca, hücrelerin mitoz giriş hızını gösteren bir parametre olduğundan dolayı Mİ'deki düşüş Chlorthiophos ve Anilofos'un hücre döngüsünün ilerleyişini inhibe ettiğini, dolayısıyla sitotoksik bir etkiye sebep olduğunu düşündürmektedir. Mİ değerlerindeki azalmalar, her iki pestisit için de süreye ve doza bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Sonuçlar, Chlorthiophos ve Anilofos'un mitoz bölünmeyi olumsuz yönde etkileyerek hücre bölünmesini baskı altına almış olabileceğini işaret etmektedir.

Moore vd. (2011), yaptıkları çalışmada Malathion'un Sprague-Dawley cinsi ratlarda kemik iliği ve periferik kanlarında mitotik indekste düşüslere neden olduğunu tespit etmiş olup bu sonuçlar bizim çalışmamıza benzerlik göstermektedir.

Yüzbaşıoğlu vd. (2006), Afugan adlı bir fungusitin, kullanılan dört ayrı konsantrasyondan (2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml) en düşük doz dışındaki dozlarda Mİ'yi anlamlı bir şekilde düşürdüğünü saptamıştır. Malathion'un insan periferik lenfositlerindeki sonuçlarına bakıldığında ise Mİ değerlerinde tüm dozlarda önemli derecede bir azalış gözlenmiştir (Balaji and Sasikala 1993).

Rojas vd. (1993), test edilen kimyasal maddenin sitotoksik ve/veya sitostatik etkilerini birbirinden ayırmak için, Mİ ve KKD testindeki proliferasyon indeksi (PI) inhibisyonları arasındaki ilişkinin tespit edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. PI, kimyasal maddelerin DNA replikasyonu üzerine etkisini, Mİ ise mitoz bölünme üzerine etkisini göstermektedir.

Bu çalışmada Chlorthiophos ve Anilofos'un her ikisi de 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde kontrol grubuna yakın değerlere sahip olup Pİ üzerinde herhangi bir anlamlı azalış göstermemiştir. Bu da, çalışılan pestisitlerin DNA replikasyonu üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını göstermektedir. Hücre bölünme kinetiğini ifade eden bir parametre olan Pİ, test edilen bileşiğin sitotoksitesini analiz etmek üzere kullanılır. Çünkü test edilen kimyasal maddenin hücre siklusu ile etkileşime geçmesi bu indeksi hızlandırır veya geciktirir (Sivikova and Dianovsky 2000). Ancak bu çalışmada maddelerin Pİ'de herhangi bir etki görülmez iken Mİ'de düşüş tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada Chlorthiophos için Mİ ve KKD'deki Pİ arasında 24 saatlik uygulama süresinde herhangi bir ilişki saptanamamışken 48 saatlik uygulama süresinde Pearson korelasyon testine göre her ikisinde de %44,2 oranında ($p \leq 0,05$) bir artış tespit edilmiş olup pozitif yönde bir ilişki saptanmıştır. Anilofos'ta ise her iki uygulama süresinde de artış saptanmış olup yine pozitif yönde bir ilişki söz konusudur. Sivikova ve Dianovsky (2000), çalışmalarında, Mİ ve Pİ arasında pozitif ilişki bulunmasının test edilen kimyasalın sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlarda yine Chlorthiophos ve Anilofos'un DNA replikasyonu üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmamasına rağmen Mİ'de azalmalara neden olmasından dolayı sitotoksik etki gösterdiğini destekler yöndedir.

Yüzbaşıoğlu vd. (2006)'nin Afugan pestisiti ile yaptıkları çalışma Mİ'nin düşmesi ancak bu maddenin Pİ'yi etkilememesi bakımından yaptığımız çalışmaya uygunluk göstermektedir. Yine Satar vd. (2009), organik fosforlu pestisitlerle zehirlenen 40 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada da Pİ bakımından herhangi bir farklılık gözlenmemiş olup bu verilerde çalışmamızla örtüşmektedir. Dolayısıyla çalışmamıza paralel olarak yapılan diğer çalışmalarda da kullanılan maddelerin DNA replikasyonunu olumsuz yönde etkilemediği sonucuna varabiliriz.

Epel (1963), Jain ve Andsorbhoy (1988), kimyasalların hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tutmaları ve dolayısıyla ATP sentezinin azaltılması sonucu, hücre bölünmesinin yavaşlatıldığını ve sitotoksik etkinin ortaya

çıkıldığını bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar da kimyasal maddelerin KA'yı uyarma yoluyla sitotoksik etkiye sahip olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Hilliard *et al.* 1998). Bu ifadelerle göre, *in vitro* çalışılan bu pestisitlerin insan lenfositlerinde, ya ATP üretimini baskı altında tutmasından ya da klastojenik etkisinden dolayı hücre bölünmesini azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Ayrıca Mİ'deki düşüş konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşmiş olup konsantrasyon arttıkça Mİ'de bir düşüş gözlenmiştir. Chlorthiophos ve Anilofos'ta her iki uygulama süresinden elde edilen Mİ değerleri ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile tespit edilmiş ve konsantrasyon artışına bağlı olarak Mİ'de bir azalış belirlenmiştir. Dolayısıyla aralarında negatif yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda KA frekansı ile Mİ arasında da negatif yönde bir ilişki saptanmış olup her iki uygulama süresinde de konsantrasyona bağlı olarak KA frekansında bir artış olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla KA frekansı arttıkça toksisite de arttığından Chlorthiophos ve Anilofos'un daha yüksek dozlarda kullanıldığında daha fazla aberasyona ve kırıklara neden olabileceği kanısına varmış bulunmaktayız.

İnsan hücrelerinde DNA hasarlarının kromozom seviyesinde güvenilir olarak değerlendirilmesini sağlayan MN yöntemi genetik toksikoloji alanında çok yoğun olarak kullanılmaktadır (Fenech 1993, Lando *et al.* 1998, Schuler *et al.* 2010). MN sayısındaki artış, çeşitli kimyasal maddelerin hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Fenech and Morley 1985a, Ford *et al.* 1988, Vanparys *et al.* 1990, Zijno *et al.* 1994).

MN test yönteminde bir kez bölünmüş olan iki nükleuslu hücreler değerlendirmeye alınmıştır. Ancak bu yöntemde, hücre kültürünün 48. saatinde hücreler bir kez bölünmüş olmalarına rağmen, hem daha fazla iki nükleuslu hücre elde etmek hem CBPİ oranını saptamak için 68 saatlik kültür süresi uygulanmıştır (Gökalp Muranlı 2006).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre total %BNMN'de 24 saat ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de doza bağlı bir artış söz konusu olup sadece 200 µg/ml konsantrasyonda MN indüksiyonu gözlenmiştir. Yani bu madde MN oluşumunu özellikle, 200 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı olarak artırmıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de elde edilen değerler birbirine oldukça yakın olarak tespit edilmiş ve süreye bağlı bir artış söz konusu olmayıp sadece konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmiştir.

Chlorthiophos'un dışında organik fosforlu bir pestisit olan Phosphamidon ile yapılan bir çalışmada da MN sayısındaki artış bakımından bu çalışmaya göre bir benzerlik söz konusudur. Cicchetti vd. (1999), fare kemik iliği hücrelerinde MN testini uygulamış ve sonuç olarak hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sürelerinde bu maddenin MN oluşumunu artırdığını tespit etmişlerdir.

Bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus*'un lenfosit ve solungaç dokularında da Chlorpyrifos'un farklı konsantrasyonlarının MN frekansını artırdığı gözlemlenerek, sonuçları bizimkilere benzerlik göstermiştir (Ali *et al.* 2008). Ayrıca, Yin vd. (2009) tarafından, Chlorpyrifos bir kara kurbağası olan *Bufo bufo gargarizans* üzerine uygulanmış ve iribaşların eritrositlerindeki MN frekansında önemli derecede artışlar gözlemlenmiştir.

Meretrix ovum bir organik fosforlu pestisit olan Monocrotophos'a farklı konsantrasyonlarda maruz bırakılmış ve daha sonra solungaçlarındaki MN frekansı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak bu türde doza bağlı olarak MN frekansında bir artış olduğu saptanmış ve bu maddenin, çalışılan organizmalarda kromozom hasarlarına sebep olduğu kanısına varılmıştır (Revankar and Shyama 2009).

Bir kolinesteraz enzim inhibitörü olan Afugan, organik fosforlu fungusitler grubuna girmekte olup bu maddenin insan periferal lenfositlerinde MN testi ile genotoksitesisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada 24 ve 48 saat olmak üzere iki uygulama süresi ve pestisit 2,5, 5, 10 ve 20 µg/ml olmak üzere dört farklı konsantrasyonu lenfositlere uygulanmıştır. Sonuçta, MN frekansında tüm dozlarda doza bağlı olarak anlamlı bir artış gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar da Afugan'ın insan periferal lenfositlerinde klastojenik ve sitotoksik olabileceğini göstermiştir (Yüzbaşıoğlu *et al.* 2006).

Gollapudi vd. (1995), *in vivo* olarak fare kemik iliğinde uygulanan MN testinde Chlorpyrifos'un herhangi bir genotoksik aktiviteye sahip olmadığını gözlemleyerek bizimkilerden farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak araştırmacılar çalışmayı *in vivo* olarak gerçekleştirmiş ve farklı bir organizma üzerinde uygulama yapmışlardır. Farklı organizmaların kullanılması bu test sistemlerinde farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Dolayısıyla çalışmalar sırasında bir maddenin mutajenik, genotoksik ya da sitotoksik etkisi belirlenirken tek bir test sistemi yerine kombine testlerin kullanılması güvenilir sonuçların elde edilmesi bakımından önemlidir.

Bu çalışmada, hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sürelerinde KA frekansı ile MN frekansı arasında Pearson korelasyon testine göre istatistiksel olarak önemli bir ilişki belirlenmiştir (Pearson korelasyon $p \leq 0,001$). Yani Chlorthiophos, her iki uygulama süresinde hücre başına düşen toplam KA oranını arttırmış ve bu artış MN frekansında da aynı oranda bulunmuştur. Dolayısıyla sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testinde, MN frekansında bir artış gözlenmesi bu maddenin klastojenik potansiyele sahip olduğunu gösterir. Yapılan bu çalışmada, Chlorthiophos'un sayısal anomaliden daha çok yapısal kromozom anomalilerine neden olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle; MN oluşumunun Chlorthiophos'un anöjenik değil de, daha çok klastojenik etkisinden dolayı olduğu düşünülebilir. Fenech vd. (2003), yaptıkları çalışma sonucunda, eğer MN oluşumuna kromozomlardan kopan bir parça neden olursa (asentrik bir kromozom parçası), bunun

klastrojenik bir olayın sonucu olduğunu; eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı olursa, bu duruma anöjenik bir maddenin neden olduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada MN oluşumunun klastrojenik maddelerden kaynaklanabileceğinin tespitinden dolayı bu oluşumların genellikle asentrik kromozom parçalarından meydana geldiği düşünülebilir.

Ayrıca Högstet ve Karlsson (1985), geliştirdikleri modifiye metodlarla, aneuploidiye yol açan maddeler ile klastrojenleri birbirinden ayırmada, MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastrojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozom fragmentleri içeren küçük, anöjenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içerdiğini ve daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Fenech ve Crott (2002)'un bildirdiklerine göre; klastrojenlere maruz kalmış binükleer hücrelerde nükleoplazmik köprüler de gözlemlenir. Bu köprüler iki nükleusu birleştirir. Nükleoplazmik köprü oluşumlarının, anafazda kromozomların sentromerlerin zıt kutuplarına çekilerek disentrik kromozom oluşumu nedeniyle gerçekleştiğini ve bir ya da daha fazla nükleoplazmik köprünün yanındaki 1'li veya 2'li MN'lerin %60'ından daha fazlasının asentrik kromozom parçasından orijin aldığını göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada da nükleoplazmik köprülere rastlanmış olması ve genellikle küçük boyutlu MN'lerin tespit edilmesi MN'lerin asentrik kromozom fragmentlerinden kaynaklanabileceğini desteklemektedir.

Anilofos'ta ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sürelerinde %BNMN'de istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlenmemiş olup, değerler genellikle kontrol grubu değerlerine yakın olarak elde edilmiştir. Dolayısıyla MN testinde Anilofos'un klastrojenik olduğundan bahsedemeyiz.

Fenech vd. (1997)'in bildirisine göre; KKD ve MN testlerinde elde edilen Pİ ve CBPI ortalama değerleri hücre siklusu kinetiğinin ölçülmesini sağlamakta ve bu ölçümler belli kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkileri hakkında önemli verileri

yansıtmaktadır. CBPI; hücrelerin bölünme hızlarını ölçmektedir. Yani sitostatik etkiyi göstermektedir (Eke 2007). Yaptığımız çalışmada her iki pestisitte de CBPI oranında görülen düşüşler sonucunda bu maddelerin insan lenfositleri üzerinde doz artışına bağlı olarak hücrenin bölünme hızını azaltma potansiyellerinin olduğu dolayısıyla hücre bölünmesini engelledikleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda test edilen kimyasal maddelerden biri olan Chlorthiophos *in vitro* insan lenfosit kültüründe MN testinde 24 saatlik uygulama süresinde doza bağlı azalış göstermekle beraber sadece 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda, 48 saatlik uygulama süresinde ise sadece 200µg/ml konsantrasyonlarda; Anilofos ise yine doza bağlı bir azalış göstermiş olup her iki uygulama süresinde de sadece 200 µg/ml konsantrasyonda CBPI değerlerini anlamlı olarak azaltarak sitotoksik etki göstermiştir. Bu konsantrasyonlardaki azalmalar yüzde olarak değerlendirildiğinde Chlorthiophos için 100 µg/ml konsantrasyonda %88, 200 µg/ml konsantrasyonda ise %74,7 oranında; Anilofos için ise 200 µg/ml konsantrasyonda %81 oranında olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla her iki madde için de daha yüksek konsantrasyonlar kullanılacak olursa daha fazla oranda sitotoksik etki gözlenmesi kaçınılmazdır.

Çalışmamıza benzer olarak, Pastor vd. (2003)'nin yaptıkları çalışmada, yoğun tarımsal aktiviteleri ile karakterize edilen Yunanistan, İspanya, Polonya ve Macaristan'da işi gereği pestiside maruz kalan popülasyonlarda, pestisit kullanımı ile sitogenetik zararlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için, toplam 239 tarım işçisi ve 231 pestisite maruz

kalmamış kontrol kan vericilerinin, periferik kan lenfositlerinde ve ağız mukozası epitelyum hücrelerinde MN testi uygulanmış ve sonuçta pestisite maruz kalan bireylerde, kontrolle kıyaslandığında CBPI'de önemli bir azalma saptanmıştır.

Aynı zamanda MN testinde Chlorthiophos'un CBPI azalmasını indüklemesinin yanı sıra MN oluşumunda da yine aynı dozlarda bir artışa neden olmasından dolayı sitotoksikite

ile klastojenite arasında da bir ilişki görülmektedir. Ancak bu durumu Anilofos için söyleyemeyiz. Çünkü, Anilofos CBPI değerlerinde, 200 µg/ml konsantrasyonda bir azalmaya sebep olduğu halde, MN frekansı değerleri kontrol grubuna yakın bir şekilde elde edilmiştir.

Çalışmamız sırasında hem Chlorthiophos hem de Anilofos için kullanılan dört kişide de kullanılan kimyasal maddeler farklı etki göstermiştir ve elde edilen değerlerde farklılıklar gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, kişilerin farklı genetik yapılarına bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir.

Farklı test sistemlerinde çok farklı sonuçların elde edilmesi test edilen maddenin üç boyutlu yapısı, molekül şekli ve büyüklüğü ile alakalı olabilir. Aynı zamanda test sistemi için kullanılan organizma türü de farklı sonuçların elde edilmesine sebep olabilir. Pestisitlere maruz kalmış bireylerde oluşan bu farklı sonuçlar, bireylerin yaşam tarzı, iklimsel ve çevresel koşullar, kullanılan farklı pestisit ve kullanım miktarları, maruz kalma süresi ve bireylerin beslenme alışkanlığı ile yakından ilişkilidir. Aynı zamanda çeşitli genotoksik maddeler her organizmanın metabolizmasında çok farklı değişikliklere uğrayabilmektedir. Bu nedenle, bu maddelerin etkisine karşı hücresel seviyede oluşan farklılıklar da bu kadar farklı sonuç elde edilmesine neden olabilmektedir (Omenn 1991).

DNA yapısı temel olarak bütün organizmalarda benzerdir, fakat toksik maddenin ne kadar ve hangi formda DNA'ya ulaşacağını etkileyen sekonder faktörler genetik toksisiteyi değerlendirmek için önemli bir kriterdir. Bunların yanında, hedef DNA'nın büyüklüğü ve DNA onarım mekanizması da genotoksik tehlikenin ortaya çıkmasında oldukça önemlidir. Bu parametreler de organizmadan organizmaya değişmektedir (Brusick 1988).

Bitkilerde ve hayvanlarda KA, KKD ve MN formasyonunun görülmesi, bu maddelerin tüm organizmalardaki DNA ile etkileşime girerek DNA hasarı meydana getirdiğini göstermektedir. DNA hasarının meydana gelmesi, serbest radikallerin oluşmasıyla da olabilmektedir (Giray *et al.* 2001).

Hücreler, metabolik prosesin bir parçası olarak, sürekli serbest radikaller (süperoksit anyon, peroksil, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri) üretirler. Serbest radikaller; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler ve vitamin A, E ve C gibi enzimatik olmayan oksidanlardan oluşan bir antioksidan savunma sistemi ile nötralize edilirler (Urso and Clarkson 2003).

Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, süperoksit dismutaz aracılığında hidrojen peroksit ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini engellerken, lipid peroksidasyonunu hızlandırırlar (Kaya vd. 1998, Mates 2000).

Lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan malondialdehit gibi sitotoksik aldehitler DNA ve proteinlere bağlanarak kalıcı hasara neden olur (Çiçek 2005). Reaktif oksijen türlerinin artması ve antioksidan mekanizmasının yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi olay meydana gelmektedir. Oksidatif stresin farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi hasarlara yol açtığı bilinmektedir (Williams and Jeffrey 2000, Cooke *et al.* 2003). Bizim çalışmamızda da kromozom aberasyonları arasında en sık kromatid kırığına rastlanılmıştır. DNA ipliğinde meydana gelen bu kırılmaların Chlorthiophos ve Anilofos'un neden olduğu

düşünülen reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikallerden kaynaklanabileceğini de söyleyebiliriz.

Sonuç olarak; Chlorthiophos'un mutajenitesini belirlemek üzere yaptığımız Ames testi sonuçlarına göre bu madde TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda yapılan uygulamalar dışında kullanılan tüm suşlarda herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir. Fakat TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda uygulanan beş farklı dozun tümünde kontrol grubunun iki katını aşan değerlere rastlanmıştır. Bu da, Chlorthiophos'un çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabileceğini göstermektedir.

Anilofos ile yapılan çalışmalarda ise, TA97, TA100 ve TA102 suşlarının S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğundaki uygulamalarda yine herhangi bir mutajenik aktiviteye rastlanmazken TA98 suşunun S9 fraksiyonu yokluğunda uygulanan deneylerde 1000 µg/plak, 100 µg/plak ve 10 µg/plak dozlarında kontrol grubuna göre iki kata yakın değerler elde edilmiş olup bu üç dozda Anilofos mutajenik bulunmuştur. Bu da, Anilofos'un çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabileceği anlamına gelmektedir.

Chlorthiophos 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinin her ikisinde de KKD üzerinde herhangi bir anlamlı artışa neden olmadığından dolayı genotoksik bir etkiye sahip değildir. Aynı yorumu Anilofos için de söyleyebiliriz. Çünkü Anilofos'ta her iki uygulama süresinde KKD frekansında istatistiksel açıdan herhangi bir artışa neden olmamıştır.

Chlorthiophos her iki uygulama süresinde de sadece 200 µg/ml konsantrasyonda KA ve MN frekansında artışa neden olduğundan dolayı bu maddenin klastojenik etkisinden bahsedilebilir. Anilofos ise KA frekansında artışlara neden olmuşken MN frekansında

istatistiksel olarak bir anlamlılık yoktur. Ancak KA frekansındaki artışta bize bu maddenin klastojenitesi hakkında bilgi vermektedir.

Chlorthiophos ve Anilofos'un Pİ üzerinde herhangi bir etki göstermediklerinden dolayı DNA replikasyonunu olumsuz yönde etkilemediklerini ancak Mİ ve CBPI'de düşüşler gözlemlendiğinden sitotoksik oldukları kanısına varılabilir. Yani, hücre bölünmesini ve nükleus bölünmesini baskı altına alıyor olabilirler. Özellikle son konsantrasyon olarak kullandığımız 200 µg/ml'lik konsantrasyonda her iki maddede de Mİ'de düşüşlerin gözlenmesi ve KA frekansındaki artışlar bu maddelerin yüksek dozlarda oldukça tehlikeli olabileceğini ve çok sayıda aberasyona neden olabileceğinin bir göstergesidir. Bu yüzden bu organik fosforlu pestisitler tarım alanlarında kullanıma sunulurken yüksek dozlarda kullanılmamalı ve tarım işçilerinin dikkatli olması ve koruyucu önlemler alması gerekmektedir.

Kimyasal maddelerin çevremizde çok sayıda sentezlenmesi ve çok çeşitli olmaları, onların etki mekanizmalarının araştırılmasını zorunlu kılmış ve bunun sonucunda birçok test sisteminin gelişmesi ve farklılaşmasına neden olmuştur. Kullanılan kimyasal maddelerin tek bir test sistemi ile araştırılması güvenilir sonuçlar elde edilememesine sebep olmaktadır. Çünkü farklı test sistemlerinde farklı organizmalar ve farklı yöntemler kullanıldığından dolayı elde edilen sonuçlarda çeşitlilik gösterebilmektedir. Dolayısıyla bir kimyasal madde tek bir test yöntemi ile değil birbiriyle kombine olan ve farklı organizmaların kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* birçok test sistemi ile kontrol edilirse daha güvenilir sonuçlar elde edilecek ve sonuçların birbiriyle karşılaştırılma imkânı doğabilecektir.

Yaptığımız bu çalışma ile hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalar üzerinde Anilofos ve Chlorthiophos pestisitlerinin etkisi sitogenetik ve genotoksik açıdan değerlendirilmiştir. Dört farklı test sistemi kullanılarak yaptığımız çalışmada iki farklı

pestisit için sonuçların güvenilirliği arttırılmıştır. Bu çalışmada yer almayan diğer genotoksisite test sistemleri kullanılarak sonuçların desteklenebileceği düşüncesindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Adhikari, N. and Grover, I.S. (2006). Genotoxic effects of some systemic pesticides: *In vivo* chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12(2)**: 235-242.
- Adler, I.D. (1984). Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt, S. and Parry, J.M. (Eds.), *Mutagenicity testing*, IRL Press, Washington.
- Aggarwal, R., Ward, J., Balasundaram, I., Sains, P., Athanasiou, T. and Darzi, A. (2007). Proving the effectiveness of virtual reality simulation for laparoscopic surgical training. *Annals of Surgery*, **246**: 771-779.
- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodré, E., Pinto, L.F.R. and Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide Temephos, *Genetics and Molecular Research*, **1(2)**: 159-166.
- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone, P. (1999). DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*. *Mutation Research*, **429**: 239-248.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, **463**: 111-172.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R. and Kushwaha, B. (2008). Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere*, **71**: 1823-1831.
- Alink, G.M., Quik, J.T.K., Penders, E.J.M., Spenklink, A., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L. and Hoogenboezem, W. (2007). Genotoxic effects in the Eastern mudminnow

- (*Umbra pygmaea* L.) after exposure to Rhine water, as assessed by use of the SCE and comet assays: A comparison between 1978 and 2005. *Mutation Research*, **631**: 93-100.
- Almassy, Z., Krepinski, A.B., Bianco, A. and Köteles, G.J. (1987). The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Applied Radiation and Isotopes*, **38**: 241-249.
- Amer, S.M. and Aly, F.A. (1992). Cytogenetic effects of pesticides. IV. cytogenetic effects of the insecticides Gardona and Dursban. *Mutation Research*, **279(3)**: 165-170.
- Ames, B.N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer. *Science*, **204**: 587-599.
- Ames, B.N. and McCann, J. (1981). Validation of *Salmonella* test: A reply to risk us and legator. *Cancer Research*, **41**: 4192.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. (1973a). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**: 2281-2285.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90(17)**: 7915-7922.
- Anderson, D. (1988). Human biomonitoring. *Mutation Research*, **204**: 353-541.
- Anonim, 1985. Post Graduate Summer Course Notes on Molecular Biology and Genetics Engineering in Turkish. TÜBİTAK.
- Antunes-Madeira, M.C. and Madeira, V.M.C. (1979). Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biocihimica et Biophysica Acta*, **550**: 384-392.

- Asal, S. (1983). Türkiye’de Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Pestisitlerin Mutagen Etkilerinin *Salmonella typhimurium* Histidin Mutantlarıyla Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu, Ankara.
- Ateş, A. (2002). Moleküler Biyoloji. Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, 9. Bölüm, Konya, 113-121.
- Aufderheide, M. and Gressmann, H. (2007). A modified Ames assay reveals the mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas vapour phase. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **58**: 383-392.
- Baden, J.M. and Simmon, V.F. (1980). Mutagenic effect of inhalation anesthetics. *Anesthesiology*, **75**: 169-189.
- Bağcı, H. (1985). Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi.
- Bahçeci, Z. (2002). Moleküler Biyoloji. Gazi Üniversitesi, Kırşehir Eğitim Fakültesi, 2. Baskı, 10. Bölüm, Ankara, 209-216.
- Balaji, M. and Sasikala, K. (1993). Cytogenetic effect of Malathion in *in vitro* culture of human peripheral blood. *Mutation Research Letters*, **301(1)**: 13-17.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del Ry, G., Andreassi, M.G., Ballardin, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F. and Landi, S. (1998). Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environmental Molecular Mutagen*, **31**: 228-242.
- Barile, F.A. (2008). Principles of Toxicology Testing. CRC Press Taylor & Francis Group, St. John's University, Queens, New York.

- Barquinero, J.F., Barrprios, L., Caballin, M.R., Miro, R. and Ribas, A. (1993). Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutation Research*, **286**: 275-279.
- Bedford, C.T. and Robinson, J. (1972). The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica*, **2**: 307-337.
- Behera, B.C. and Bhunya, S.P. (1987). Genotoxic potential of an organophosphate insecticide, Phosphamidon (Dimecron): An *in vivo* study in mice. *Toxicology Letters*, **37(3)**: 269-277.
- Behera, B.C. and Bhunya, S.P. (1989). Studies on the genotoxicity of Asataf (Acephate), an organophosphate insecticide, in a mammalian *in vivo* system. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **223(3)**: 287-293.
- Belser, J.R., Shaffer, W.B., Bliss, S.D., Hynds, E.D., Yamamoto, H.M., Pitts L. and Winer, J.A. (1981). A standardized procedure for quantification of the Ames/*Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Environmental Mutagenesis*, **3**: 123-139.
- Besser, R. and Gumann, L. (1994). Intoxication with organophosphorus compounds. In: Vinken, P.J., Bruyn, G.W. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, Amsterdam, 151-181.
- Bhunya, S.P. and Jena, G.B. (1993). Studies on the genotoxicity of Monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick *in vivo* test system. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, **292(3)**: 231-239.
- Bilgin, M. (1992). Studies On The Mutagenicity Of An Organophosphorus Pesticide Trichlorfon. Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Boath, S.C., Welch, A.M. and Garner, R.C. (1980). Some factors affecting mutant numbers in the *Salmonella*/microsome assay. *Carcinogenesis*, **1(11)**: 911-923.

- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M. Strömberg, U., Vermeulen, R. and Tucker, J.D. (2005). Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **45**: 258-270.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkilä, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E. and Norppa, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, **60**: 1619-1625.
- Bonassi, S., Lando, C., Ceppi, M., Landi, S., Rossi, A.M. and Barale, R. (2004). No association between increased levels of high-frequency sister chromatid exchange cells (HFCs) and the risk of cancer in healthy individuals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **43**: 134-136.
- Brooks, T.M., Dean, B.J., Hutson, D.H. and Potter, D. (1982). Microbial mutation studies with Tetrachlorvinphos (Gardona). *Mutation Research*, **105(4)**: 211-221.
- Brusick, D. (1988). Evolution of testing strategies for genetic toxicity. *Mutation Research*, **205**: 69-78.
- Burden, D.A. and Osherof, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biocihimca et Biophysica Acta*, **1400(1-3)**: 139-154.
- Büssing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A. and Schweizer, K. (1994). *Viscum album* L. extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Cancer*, **30**: 1836-1841.
- Carere, A., Ortali, V.A., Cardamone, G. and Morpurgo, G. (1978). Mutagenicity of Dichlorvos and other structurally related pesticides in *Salmonella* and *Streptomyces*. *Chemico-Biological Interactions*, **22(2-3)**: 297-308.
- Carrano, A.V. and Natarajan, A.T. (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, **204(3)**: 379-406.

- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindi, P.A. and Andminkler, J.L. (1978). Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, **271**: 551-553.
- Cebulska-Wasilewska, A., Nowak, D., Niedzwffidz, W., Wagner, E.D. and Plewa, M.J. (1999). Studies on the genotoxic effects of Aminophenazines using two cellular models and three different methods. *Mutation Research*, **446**: 57-65.
- Cerna, M., Pastorkovea, A., Smid, J., Dobias, L. and Rossner P. (1998). The use of YG bacterial tester strains for monitoring of drinking water mutagenicity. *Toxicology Letters*, **96**: 335- 339.
- Ceylaner Başkaya, G. (1997). Şizofrenili Olgularda Kardeş Kromatid Değişimlerinin (Sister Chromatid Exchange-SCE) Araştırılması. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Sivas.
- Chen, H.H., Sirianni, S.R. and Huang, C.C. (1982). Sister-chromatid exchanges and cell-cycle delay in Chinese hamster V79 cells treated with 9 organophosphorus compounds (8 pesticides and 1 defoliant). *Mutation Research*, **103**: 307-313.
- Cheng, W.S., Tarone, R.F., Andrews, A.D., Whang-Peng, J.S. and Robbins, J.H. (1978). Ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges xeroderma pigmentosum and in Cockayne's Syndrome lymphocyte cell lines. *Cancer Research*, **38**: 1601- 1609.
- Chetalat, A.A., Albertini, S. and Gocke, E. (1996). The photomutagenicity of fluoroquinolones in test for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet Assay). *Mutagen*, **5(11)**: 497- 504.
- Cicchetti, R., Bari, M. and Argentin, G. (1999). Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an *in vivo* study in mice. *Mutation Research*, **439**: 239-248.
- Cleaver, J.E., Mitchell, D.L, Feeney, L. and Afzal, V. (1996). Chromatid exchanges may be induced by damage in sites of transcriptional activity. *Mutagenesis*, **11(2)**: 183-187.

- Cole, J. and Skopek, T.R. (1994). International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, working paper 3, somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo*. *Mutation Research*, **304**: 33-105.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M. and Junec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanism mutation and disease. *The Faseb Journal*, **17(10)**: 1195-1214.
- Coral, M.N., Uçman, S., Yıldız, H., Öztaş, H. and Dalkılıç, S. (2009). Potential neoplastic effects of parathion-methyl on rat liver. *Journal of Environmental Sciences*, **21(5)**: 696-699.
- Countryman, P.I. and Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, **41**: 321-332.
- Çakmak, G. (2000). Trafik Polisi ve Taksi Sürücüleri Hava Kirliliği Maruziyetine Yönelik İdrarda 1-Hidroksipiren Değerlerinin, Periferik Lenfositlerde Kromozomal Aberasyon ve Mikroçekirdek Sıklığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çiçek, E. (2005). Nükleer Tıp Uygulamalarının Hastalardaki Serbest Radikaller Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Dağlıoğlu, N. (2004). Akut Organofosfatlı Pestisit Entoksikasyonlarının Sıçanlarda Deneysel Olarak Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Das, P. and John, G. (1999). Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations *in vivo* in *Etropus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters*, **104**: 111-116.

- De Serres, F.J. and Ashby, J. (1981). Evaluation of short-term tests for carcinogens. Elsevier Science Publishers (Progress in Mutation Research, Vol. 1), Amsterdam, Oxford, New York.
- Dean, B.J., Brooks, T.M., Hodson-Walker, G. and Hutson, D.H. (1985). Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals. *Mutation Research*, **153**: 57-77.
- Debnath, A.K., Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A.J. and Hansch, G. (1991). Structure activity relationship of mutagenic aromatic and hetemaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **34 (2)**: 786- 797.
- Delen, N., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. (2005). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara.
- Deliorman, D., Çalış, I., Ergün, F., Doğan, B.S., Buharalıoğlu, C.K. and Kanzik, I. (2000). Studies on the vascular effects of the fractions and phenolic compounds isolated from *Viscum album* ssp. *album*. *Journal of Ethnopharmacology*, **72**: 323-329.
- Demirel, Ş. ve Zamani, A. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Selçuk Üniversitesi Genel Tıp Dergisi*, Konya, **12(3)**: 123-127.
- Demiroğlu, C. (2003). Ereğli Demir-Çelik Fabrikası Kok Fırını İşçilerinde Genotoksik Hasarın Mikroçekirdek ve Kromozomal Aberasyon Teknikleri ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Desesso, J.M., Lavin, A.L., Hsia, S.M. and Mavis, R.D. (2000). Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 1021-1041.
- Dharmani, C. and Jaga, K. (2005). Epidemiology of acute organophosphate poisoning in hospital emergency room patients. *Reviews of Environmental Health*, **20**: 215-232.

- Dirican, E.K. (2007). Dichlorvos'un Sıçan Testisleri Üzerine Toksik Etkisi ve Vitamin C ve E'nin Koruyucu Rolü. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dolara, P., Salvadori, M., Capobianco, T. and Torricelli, F. (1992). Sister chromatid exchanges in human lymphocytes induced by Dimethoate, Omethoate, Deltamethrin, Benomyl and their mixture. *Mutation Research*, **283**: 113-118.
- Dökmeci, I. (1994). Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi. Toksikoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 547-588.
- Du Praw, E.J. (1970). DNA and Chromosomes. Holf, Rinehart and Winston, New York.
- Durusoy, M. and Kambur, S. (2003). The application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water. *Türk Biyokimya Dergisi*, **28 (1)**: 3-7.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989). Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutation Research*, **224**: 517-525.
- Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J.C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S.B. and Smit, L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world- a minimum pesticides list. *The Lancet*, **360**: 1163-1167.
- Eisha, A.A., Marcos, R. and Creus, A. (2004). Genotoxicity studies on the antimicrobial drug Sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, **564**: 51-56.
- Eke, D. (2007). Thimerosal'ın İnsan Lenfosit Hücre Kültürlerinde Genotoksik, Mutajenik ve Toksik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Epel, D. (1963). The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in Sea Urchin egg. *The Journal of Cell Biology*, **17**: 315-319.

- Eren, Y. (2011). Bazı *Limonium* Türlerine Ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T. and Kaya, F. (2007). Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International*, **33(7)**: 877-885.
- Evans, H.J. (1983). Cytogenetic methods for detection effects of chemical mutagens. *Annals New York Academy of Sciences*, **83**: 131-140.
- Evans, H.J., Gooden, J.R., Mitchell, R.R. and Buckland, R.A. (1974). Location of human satellite DNAs on the Y chromosome. *Nature*, **251**: 346-347.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, **339(1)**: 37-59.
- Fender, H. and Wolf, G. (1998). Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites. *Toxicology Letters*, **96**: 149- 154.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis blocks micronucleus technique. A detailed description on the method and its application to genotoxicity studies in human population. *Mutation Research*, **285**: 35-44.
- Fenech, M. (2000). The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, **455**: 81–95.
- Fenech, M. and Crott, W.J. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, **504**: 131-136.

- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985a). Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*, **148**: 29-36.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985b). The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research*, **148**: 99-105.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003). Human micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, **534(1-2)**: 65-75.
- Fenech, M., Dreosti, I.E. and Rinaldi, J.R. (1997). Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis*, **18**: 1329-1336.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E. and Bonassi, S. (1999). The human micronucleus project- an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, **428**: 271-283.
- Ford, J.H., Schultz, C.J. and Correll, A.T. (1988). Chromosome elimination in micronuclei: A common of hypoploidy. *The American Journal of Human Genetics*, **43**: 733-740.
- Forman, D. and Ames, B. (1991). The Ames test and the causes of cancer. *Reprinted from the British Medical Journal*, **303**: 428- 429.
- Friedberg, E.E., Walker, G.C. and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, USA.
- Garcia, A.M., Benavides, F.G., Fletcher, T. and Orts, E. (1998). Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, **24 (6)**: 473-480.

- Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1990). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Kirkland D.J. (Eds.), Cambridge University Press, 13-61.
- Gedikli, S. (2001). Kayseri İli İçme Sularında Organoklorlu Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Giray, B., Gürbay, A. and Hıncal, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or Allopurinol. *Toxicological Letters*, **118**: 139-146.
- Gollapudi, B.B., Mendrala, A.L. and Linscombe, V.A. (1995). Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide Chlorpyrifos. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **342(1-2)**: 25-36.
- Gomez-Arroyo, S., Oriega-Aldana, Arez-Rodriguez, D. and Illalobos-Pietrini, R. (1987). Sister chromatid exchanges induced by the Phoxim and Methyl azinfos in cultured human lymphocytes. *Contamination Ambiental*, **3**: (63-70).
- González Borroto, J.I., Creus, A. and Marcos, R. (2001). Genotoxic evaluation of the Furylethylen derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, **497**: 177-184.
- González Borroto, J.I., Creus, A. and Marcos, R. (2002). Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofor-2-yl)-2- nitroethene in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, **519**: 179-185.
- Gökalp Muranlı, F.D. (2006). Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Grant, C.J., Pewell, J.N. and Radford, S.G. (1977). The induction of chromosomal abnormalities by inhalational anesthetics. *Mutation Research*, **46(3)**: 177-184.

- Gülten, T., Tokyay, N., Demiray, M., Gülten, M., Ercan, I., Evke, E., Sardaş, S. and Karakaya, A.E. (2002). The role of triple therapy, age, gender and smoking on the genotoxic effects of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of International Medical Research*, **30**: 380- 385.
- Haack, T., Erdinger, L. and Boche, G. (2001). Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of Nitroso and respective Hydroxylamine compounds. *Mutation Research*, **491**: 183-193.
- Hara, M., Kogiso, S., Yamada, F., Kawamoto, M., Yoshitake, A. and Miyamoto, J. (1989). Mutagenicity studies on Fenitrothion in bacteria and mammalian cells. *Mutation Research*, **222(1)**: 53-61.
- Hass, B.S., Heflich, R.H., Shaddock, J.G. and Casciano, D.A. (1986). Comparison of mutagenicities in a *Salmonella* reversion assay mediated by uninduced hepatocytes and hepatocytes from rats pretreated for 1 or 5 days with Aroclor 1254. *Environmental Mutagenesis*, **7**: 391-403.
- Hayes, W.J. and Laws, E.R. (Eds.). (1991). Handbook of Pesticide Toxicology. volume 2, Classes of Pesticides. Academic Press, New York, 938.
- Hazarika, A. and Sarkar, S.N. (2001). Effect of Isoproturon pretreatment on the biochemical toxicodynamics of Anilofos in male rats. *Toxicology*, **165**: 87-95.
- Healy, C.E., Kier, L.D., Broeckaert, F. and Martens, M.A. (2003). A review of the genotoxicity of Triallate. *International Journal of Toxicology*, **22(3)**: 233-251.
- Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research*, **532**: 103-115.
- Helvacı, N.D. (2003). Methidathion İnsektisinin *Allium cepa* L. Kök Ucu Hücrelerinde Mitoz Bölünme ve Kromozomlara Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Hilliard, C.A., Armstrong, M.L., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K. and Galloway, S.M. (1998). Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **31(4)**: 316-326.
- Högstedt, B. and Karlsson, A. (1985). The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutation Research*, **156**: 229-232.
- Hreljac, I. and Filipic, M. (2009). Organophosphorous pesticides enhance the genotoxicity of Benzo(a)pyrene by modulating its metabolism. *Mutation Research*, **671**: 84-92.
- IARC, 1991. Occupational exposures in insecticide application and some pesticides IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **53**: 267-309.
- Ilinskaya, O., Zelenikhin, P., Kolpakov, A., Karamova, N. and Margulis, A. (2004). Cytotoxic and genotoxic effects of beta-(triphenylphosphonio) ethyl carboxylate and of N,N'-bis(dihexylphosphinoylmethyl)-1,4-diaminocyclohexane. *Medical Science Monitor*, **10(8)**: 294-299.
- Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. *Cytologia*, **53**: 427-436.
- Jakab, M.G., Major, J. and Tompa, A. (2001). Follow-up genotoxicological monitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **62**: 307-318.
- Jayashree, I.V., Vijayalaxmi, K.K. and Rahiman, M.A. (1994). The genotoxicity of Hinosan, an organophosphorus pesticide in the *in vivo* mouse. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **322(2)**: 77-85.
- Jorgensen, K.V. Clayton, J.W. and Price, R.L. (1987). Evaluation of Aflotoxin B mutagenesis: Glutathione-S-transferase to the *Salmonella* mutagenicity assay. *Environmental Mutagen*, **9**: 411-419.

- Josephy, P.D., Gruz, P. and Nohmi, T. (1997). Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutation Research*, **386**: 1-23.
- Kasamatsu, T., Kohda, K. and Kawazoa, Y. (1996). Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay. *Mutation Research*, **389**: 1-6.
- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F.J. and Speit, G. (1991). Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 18(1): 28-34.
- Kaya, S., Pirinçci, A. ve Bilgili, A. (1998). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. MedisonYayın Serisi, **35**: 222-355.
- Kayaalp, O. (1995). Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Yayınları, Ankara.
- Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (2001). Casarett and Doull 's Toxicology: Basic Science of Poisons. 6 Edition, McGraw-Hill International Editions, New York.
- Kocaman, A.Y. (2007). Acetamiprid ve Alpha-cypermethrin Pestisidlerinin Tek Başına ve Karışım Halinde Kullanıldıkları Zaman İnsan Periferik Lenfositlerindeki *In Vitro* Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Konac, E., Ekmekçi, A., Barkar, V., Yılmaz, A. and Erbaş, D. (2005). Effects of Diethylstilbestrol in human lymphocytes *in vitro*: A dose and time-dependent study on genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **276**: 45–53.
- Konuk, M., Barış, A., Liman, R. and Akyl, D. (2008). A study on mutagenicity of different types of pesticides by using of Ames/*Salmonella*/microsome test system. *Fresenius Environmental Bulletin*, **17(4)**: 463-466.

- Koşar Aslan, P. (1999). Mesane Kanserli Olguların Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişim Sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Krishnaja, A.P. and Sharma, N.K. (2003). Ascorbic acid potentiates mitomycin c-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement*, **1**: 99–112.
- Kurtulmuş, S. ve Aydın, A. (2007). Dental döküm alaşımlarının genotoksitesi, mutajenitesi ve karsinojenitesi. *Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **16**: 73-78.
- Kutbay, Y.B. (2001). Sitokalsin-B ile Bloklanan Hücrelerde Yaşa Bağlı Mikronukleus Oranları. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Samsun.
- Laffon, B., Pasaro, E. and Mendez, J. (2001). Genotoxic effects of Styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, **491**: 163 172.
- Landi, S., Frenzilli, G., Millilo, P.C., Cocchi, L., Sbrana, I., Scapoli, C. and Barale, R. (1999). Spontaneous sister chromatid exchange and chromosome aberration frequency in humans: the familial effect. *Mutation Research*, **444**: 337-345.
- Lando, C., Hagmar, L. and Bonnassi, S. (1998). Biomarkers of cytogenetic damage in human and risk of cancer. The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *La Medicina Del Lavoro*, **89**: 124-131.
- Latt S.A. (1974). Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71(8)**: 3162-3166.

- Latt, S.A., Allens, S.E., Bloom, A., Carranoe, E., Falke, D., Kram, E., Schneiderr, R., Schreck, R., Tice, B., Whitfield, B. and Wolff, S. (1981). Sister chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox program. *Mutation Research*, **98**: 17-62.
- Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y. and Konuk M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of Metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and Allium test. *Chemosphere*, **80**: 1056-1061.
- Lynch, A., Harvey, J., Aylott, M., Nicholas, E., Burman, M., Siddiqui, A., Walker, S. and Rees, R. (2003). Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis*, **18(4)**: 345-353.
- Mace, M.L., Daskal, Y. and Wray, W. (1978). Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutation Research*, **52**: 199–206
- Maffei, F., Forti, G.C., Castelli, E., Stefanini, G.F., Mattioli, S. and Hrelia, P. (2002). Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutation Research*, **514(1-2)**: 49-58.
- Malley, M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *The Lancet*, **349**: 1161- 1166.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215.
- Marques, E.G.P., Oliveira, M.M., Monsanto, P.V., Proença, P., Castanheira, F., Castanheira, A.M. and Vieira, D.N. (1999). Parathion and acute intoxication: The importance of toxicological analytic tests. XXXVII. TLAFT Meeting, Krakow.
- Marrs, T.C. (1993). Organophosphate poisoning. *Pharmacology Therapeutics*, **58**: 51-66.
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M.E., Félix-Gastélum, R. and Álvarez-Torres, A. (2009).

- Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*, **35**: 1155-1159.
- Mates, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **153**: 83-104.
- McMahon, R.E., Cline, J.C. and Thompson, C.Z. (1979). Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Research*, **39**: 682-693.
- Meng, Z. and Zhang, L. (1992). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by Sodium bisulfite. *Mutation Research*, **298**: 63-69.
- Miller, E.C. and Miller, J.A. (1966). Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacological Reviews*, **18**: 805-838.
- Mitelman, F. (1995). ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger, Basel.
- Moore, P.D., Patlolla, A.K. and Tchounwou, P.B. (2011). Cytogenetic evaluation of Malathion-induced toxicity in sprague-dawley rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **Doi:10.1016/j.mrgentox.2011.07.007**.
- Morales-Remirez, P., Rodriguez-Reyes, R. and Vallarina-Kelly, T. (1990). Fate of DNA lesions that elicit sister chromatid exchanges. *Mutation Research*, **232**: 77-78.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**: 29-60.
- Murray, R.K. and Mayes, P.A. (1993). Harper'in Biyokimyası. In: Granner, D.D.K., Rodwell, V.W. Çeviren :Menteş, G., Barış Kitabevi, İstanbul, 811-917.
- Müller, S. and Kasper, W. (2000). HPSG analysis of German. In *Wahlster*, 238-253.

- Naccarati, A., Molinu, S., Mancuso, M., Siciliano, G. and Migliore, L. (2000). Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurological Sciences*, **21**: 963-965.
- Nakamura, K., Veno, H. and Sayato, Y. (1992). Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method. *Water Sciences Technology*, **25 (11)**: 293- 299.
- Nakamura, S., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I. and Sugimoto, K. (1987). SOS inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002: Examination with 151 chemicals. *Mutation Research*, **192**: 239-246.
- Namba, T., Nolte, C., Jackrel, J. and Grob, D. (1972). Poisoning due to organophosphate insecticides, acute and chronic manifestations. *The American Journal of Medicine*, **50**: 475-492.
- Natarajan, A.T. and Obe, G. (1982). Mutagenicity testing with cultured mammalian cells. cytogenetic assays, mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. Academic Pres. Inc. ISBN:0-12-336180-X.
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L.E., Lando, C., Merlo, F. and Bonassi, S. (2003). Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: A review. *Mutation Research*, **544(2-3)**: 243-254.
- Nicholas, A.H., Vienne, M. and Van den Berghe, H. (1979). Induction of sister chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: Malathion. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **67(2)**: 167-172.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabiánová, E., Srám, R.J., Kunudsen, L.E., Barale, R. and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research*, **600 (1-2)**: 37- 45.

- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folle, G.A. and Drets, M.E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutation Research*, **504**: 17-36.
- Ocak, T. (2008). Karbon Monoksitle Zehirlenme Olgularının Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. and Shinagausa, H. (1985). Evaluation of the new system (Umu Test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, **147**: 219-229.
- Oda, Y., Shimada, T., Watanabe, M., Ishidate, M. and Nohmi, T. (1992). A sensitive Umu Test system for the detection of mutagenic Nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM1011 having a high nitroreductase activity. *Mutation Research*, **272**: 91-99.
- Omari, Y.I. (2009). Cytogenetic study on workmen occupationally exposed to pesticides. *Balkan Journal of Medical Genetics*, **12(1)**: 51-59.
- Omenn, G.S. (1991). Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutation Research*, **247**: 283-291.
- Ostling, O. and Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123**: 291-298.
- Öksüzoğlu, E. (1997). Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin *Salmonella*/mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Öztaş, E. (2005). Bazı 9-süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Painter, B.R. (1980). A replication model for S.C.E. *Mutation Research*, **70**: 337-341.
- Palitti, F. (1998). Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. *Mutation Research*, **404(1)**: 133-137.
- Paolini, M. and Forti, G.C. (1997). On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays, a review. *Mutation Research*, **387**: 17-34.
- Park, J.H., Hyun, C. and Shin, H. (1999). Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, **139**: 207-213.
- Pastor, S., Creus, A., Parron, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S. and Marcos, R. (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*, **18**: 249-258.
- Pelevina, II., Aleshchenko, A.V., Gotlib, VI., Kudriashova, O.V., Semenova, L.P. and Serebrianyi, A.M. (2005). Effect of low dose irradiation on the reaction of blood lymphocytes of individuals with the somatic diseases. *Radiation Biology, Radioecology*, **45(4)**: 412-415.
- Perry, P. and Evans, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, **258**: 121-125.
- Perry, P. and Wolff, S. (1974). New giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, **261**: 156-158.
- Pitarque, M., Carbonell, E., Lapeña, N., Marsá, M., Valbuena, A., Creus, A. and Marcos, R. (1997). SCE analysis in peripheral blood lymphocytes of a group of filling station attendants. *Mutation Research*, **390**: 153-159.
- Pommier, Y., Zwelling, L.A., Kao-Shan, C., Whang-Peng, J. and Bradley, M.O. (1985). Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells. *Cancer Research*, **45**: 3143-3149.

- Purchase, I.F.H., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J.A., Anderson, D., Lefevre, P.A. and Westwood, F.R. (1978). An evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *British Journal of Cancer*, **37**: 873-959.
- Quest, J.A., Copley, M.P., Hamernik, K.L., Rinde, E., Fisher, B., Engler, R., Burnam, W.L., Fenner-Crisp, P.A. and Jonasson, J.A. (1990). Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 2. Methidathion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **12(2)**: 117-126.
- Quillardet, P. and Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. *Mutation Research*, **147**: 65-78.
- Raabe, F., Wolff, G., Janz, S., Landrock, A., Birkenfeld, T. and Herzsuh, R. (1993). Genotoxicity assesment of waste products of auminum plasma etching with the SOS chromotest. *Mutation Research*, **300**: 99-109.
- Reid, K.A., Maes, M.A., Staden, J.V., Kimpe, N.D., Mulhollve, D.A. and Verschaeve, L. (2006). Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **106**: 44-50.
- Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M. (1991). The relationship between quantities of Bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B. *Journal of Institute of Natural and Aplied Science*, **5(3)**: 19-24.
- Revankar, P.R. and Shyama, S.K. (2009). Genotoxic effects of Monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on an estuarine bivalve, *Meretrix ovum*. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 1618-1623.
- Rodriguez-Reyes, R. and Morales-Remirez, P. (2003). Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagenesis*, **18(1)**: 65-72.

- Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodriguez, R. and Ostrosky, Wegman, P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anticancer Drugs*, **4(6)**: 637-640.
- Rothfus, A., Stahl, W., Radermacher, P. and Speit G. (2000). Evaluation of mutagenic effects of Hyperbaric oxygen (HBO) *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **34(4)**: 291-296.
- Roy, S.K., Trivedi, A.H., Bakshi, S.R., Patel, R.K. Shukla P.H., Patel, S.J., Bhatavdekar, J.M., Patel, D.P. and Shah, P.M. (2000). Spontaneous chromosomal instability in breast cancer families. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **118**: 52-56.
- Ruiz, M.J. and Marzin, D. (1997). Genotoxicity of six pesticides by *Salmonella* mutagenicity test and SOS chromotest. *Mutation Research*, **390**: 245-255.
- Russell, P.J. (1998). Genetics. The Benjamin, Cummings, Publishing Company, Inc., Canada, USA.
- Satar, S., Kayraldız, A., Rencüzoğulları, E., Karakoç, E., Sebe, A., Avcı, A., Yeşilağaç, H. and Topaktaş, T. (2009). The genotoxicity and cytotoxicity among patients diagnosed with organophosphate poisoning. *Bratislavské Lekárske Listy*, **110(8)**: 476-479.
- Savage, J.R.K. (1993). Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental Molecular Mutagenesis*, **22**: 198-207.
- Scharf, J., Wiesiolek, R. and Bachmann, K. (1992). Pesticides in atmosphere. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **342**: 813-816.
- Schuler, M., Gudi, R., Cheung, J., Kumar, S., Dickinson, D., Engel, M., Szkudlinska, A., Colman, M., Maduka, N., Sherman, J. and Thiffeault, C. (2010). Evaluation of Phenolphthalein, Diazepam and Quinacrine dihydrochloride in the *in vitro* mammalian cell micronucleus test in Chinese hamster ovary (CHO) and TK6 cells.

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **702(2)**: 219-229.

Seligmann, I.C., Lima, P.D.L., Cardoso, P.C.S., Khayat, A.S., Bahia, M.O., Buchi, D.F., Cabral, I.R. and Burbano, R.R.O. (2003), The anticancer homeopathic composite Canova Method is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genetics and Molecular Research*, **2(2)**: 223-228.

Shafer, D.A. (1977). Replication bypass model o f sister chromatid exchanges and implications for Bloom's Syndrome and Fanconi's Anemia. *Human Genetics*, **39**: 177-190.

Shafer, D.A. (1982) Alternate replication bypass mechanisms for sister chromatid exchange formation, in Sandberg, A.A. (Eds.). *Sister Chromatid Exchange: Progress and Topics in Cytogenetics*, Liss, New York, **2**: 67-98.

Sharma, T. and Das, B.C. (1981). Culture media and species-related variations in the requirement of 5-bromo deoxuridine for differential sister chromatid staining. *Mutation Research*, **81**: 357-364.

Singh, A. (2009). Bioactivity of famine food plants from the family: *Amaranthaceae*, Degree of Master of Technology (Biotechnology), Durban University of Technology, Department of Biotechnology and Food Technology, Durban, South Africa.

Singh, S., Lehmann-Grube, B. and Goedde, H.W. (1984). Cytogenetic effects of Paraoxon and Methyl-parathion on cultured human lymphocytes: SCE, clastogenic activity and cell cycle delay. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **54**: 195-200.

Sinyth, D.R. and Evans, H.J. (1976). Mapping of sister chromatid exchanges in human chromosomes using G banding and autoradiography. *Mutation Research*, **35**: 139-154.

- Sivikova, K. and Dianovski, J. (2000). Mitotic index and cell proliferation kinetics as additional variables for assessment of genotoxic effect of the herbicide modown. *Acta Veterinaria Brno*, **69**: 45-50.
- Sivikova, K. and Dianovsky, J. (2006). Cytogenetic effect of technical Glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **209**: 15-20.
- Slapsite, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J. and Lazutka, J.R. (2000). Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with Nitroheterocyclic compound Furagin. *Mutation Research*, **491**: 25-30.
- Smirnova, M. and Klein, H.L. (2003). Role of the error-free damage bypass postreplication repair pathway in the maintenance of genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **532(1-2)**: 117-135.
- Solak, M (2000). Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yayın No:5, Afyon.
- Soyöz, M. ve Özçelik, N. (2003). Ziraî mücadelede kullanılan pestisidlerin sitogenetik etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **10(1)**: 6-9.
- Speit, G. and Haupter, S. (1985). On the mechanism of differential giemsa staining of Bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *Human Genetics*, **70**: 126-129.
- Stich, H.F. and Dunn B.P. (1986). Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *International Journal of Cancer*, **38**: 713-17.
- Stoilov, L., Wojcik, A.K., Giri, A. and Obe, G. (2002). SCE formation after exposure of CHO cells prelabeled with BrdU or biotin-Dutp to various DNA-damaging agents. *Mutagenesis*, **17(5)**: 399-403.

- Sugai, T., Habano, W., Jiao, Y.F., Suzuki, M., Takagane, A. and Nakamura, S. (2005). Analysis of genetic alterations associated with DNA diploidy, aneuploidy and multiploidy in gastric cancers. *Oncology*, **68(4-6)**: 548-557.
- Surrallas, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. *Mutation Research*, **341**: 169-184.
- Surralles, J., Falck, G. and Norppa, H. (1996). *In vivo* cytogenetic damage revealed by fish analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, **75**: 151-154.
- Tanrıverdi, N. (1991). Kardeş Kromatid Değişimi (SCE). Doktora Tezi Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Taylor, J.H., Woods, R.S. and Hughes, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **43**: 122-127.
- Thierens, H., Vral, A. and De Ridder, L. (1996). A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutation Research*, **360(2)**: 75-82.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T. (1997). Genotoxicity of Malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: A study of Malathion-exposed workers. *Mutation Research*, **388**: 85-95.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E. (1995). Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana.
- Topaktaş, M. ve Speit, G. (1990). Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması. *Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi*, **5(1-2-3)**: 73-84.

- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. and İla H.B. (1996). *In vivo* chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats treated with Marshal. *Mutation Research*, **371**: 259-264.
- Tucker, J.D. and Preston, J.R. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research*, **365**: 147-159.
- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R. and Carrano, A.V. (1993). Sister-chromatid exchange: Second report of the gene-tox program. *Mutation Research*, **297**: 101-108.
- Tuncok, Y. ve Aksay Hocaoglu, N. (2006). Organofosfatlı İnsektisidlerle Zehirlenme, Türkiye Klinikleri. *Journal of Surgeriy Medicinal Science*, **2**: 69-73.
- Türkez, H. (2007). Bazı Bor Bileşiklerinin *İn Vitro* Şartlarda Periferik İnsan Kanı Üzerine Genetik ve Biyokimyasal Etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Urso, M.L and Clarkson, P.M. (2003). Oksidatif stres, egzersiz ve antioksidan takviyesi. *Toxicology*, **189**: 41-54.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Research*, **244**: 95-103.
- Vervecken, W., Kleff, S., Pfuller, U. and Bussing, A. (2000). Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B- chains. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **32**: 317-326.
- Vijayalaxami R.R. and Tice, G.H.S. (1992). Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*, **271**: 243-252.

- Vural, N. (1984). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara. **56**: 32- 81.
- Vural, N. (1996). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. 344-363.
- Walker, G.C. (1985). Inducible DNA repair systems. *Annual Review of Biochemistry*, **54**: 425-457.
- Webster, L.R., McKenzie, G.H. and Moriarty, H.T. (2002). Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **133**: 112-117.
- Williams, G.M. and Jeffrey, A.M. (2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **32(3)**: 283-292.
- Wolff, S. (1977). Sister chromatid exchange. *Annual Review of Genetics*, **11**: 183-201.
- Wolff, S. (1980). Sister chromatid exchange. *Advanced Human Genetics*, **10**: 183-201.
- Wooder, M.F. and Wright, A.S. (1981). Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, **49**: 51-55.
- Wu, J.C., Chye, S.M., Shih, M.K., Chen, C.H., Yang, H.L. and Chen, S.C. (2010). Genotoxicity of Dicrotophos, an organophosphorus pesticide, assessed with different assays *in vitro*. *Environmental Toxicology*, **Doi**: 10.1002/tox.20645.
- Wulf, C.H., Kousgaard, N. and Niebuhr, E. (1986). Sister chromatid exchange in childhood in relation to age and sex. *Mutation Research*, **174**: 309-312.
- Yin, X., Zhu, G., Li, X.B. and Liu, S. (2009). Genotoxicity evaluation of Chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: *Anura*) by comet assay and micronucleus test. *Mutation Research*, **680**: 2-6.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide Afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, **604**: 53-59.

Zakharov, A.F. and Egolina, N.A. (1972). Differential spirilisation along mammalian mitotic chromosomes. 1- BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, **38**: 341-365.

Zhang, Z., Yang, L., Zhang, Q. and Cao, X. (1991). Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents. *Mutation Research*, **261**: 69-73.

Zijno, A., Leopardi, A., Marcon, F. and Crebelli R. (1994). Sex chromosome loss and non-disjunction in women: Analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma*, **104(6)**: 461-467.

İnternet Kaynakları

1- <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/031pdf>, 04.08.2011

2- <http://www.maliye.gov.tr/cevreatlasi/08tarim.pdf>, 04.08.2011

3- http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch15.pdf, 19.09.2011

4- <http://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4920>, 24.09.2011

5- <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc51.htm>, 22.10.2011

6- <http://zehirlenme.blogspot.com/2010/11/mikronukleus-olusumu.html> 09.02.2012

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek AKYIL

Doğum Yeri ve Tarihi : Afyon/10.01.1980

Yabancı Dili : İngilizce

İletişim (Telefon/e-posta) : 0 505 352 17 33/karacali@aku.edu.tr

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Afyon Lisesi/1998

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi/1998-2002

Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi/2004-2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Afyon Kocatepe Üniversitesi/2002-2011

Yayınları (SCI ve diğer) :

SCI MAKALE

1. Özkara, A., Akyl, D., Erdoğan, S.F. and Konuk, M. (2011). Evaluation of germination, root growth and cytological effects of wastewater of sugar factory (Afyonkarahisar) using *Hordeum vulgare* bioassays. *Environmental Monitoring Assessment*, **183(1-4)**: 517-524.
2. Konuk, M., Barış, A., Liman, R., Akyl, D. and Özkara, A. (2008). Study on mutagenicity of different types of pesticides by using of Ames/*Salmonella*/microsome test system. *Fresenius Environmental Bulletin*, **17(4)**: 463-466.

3. Konuk, M., Akyıl, D., Liman, R. and Özkara, A. (2008) Examination of the mutagenic effects of some pesticides. *Fresenius Environmental Bulletin*, **17(4)**: 439-442.
4. Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y. and Konuk, M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of Metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and Allium test. *Chemosphere*, **80**: 1056-1061.
5. Liman, R., Cığerci, I.H., Akyıl, D., Eren, Y. and Konuk M. (2011). Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **99**: 61–64.
6. Liman, R., Eren, Y., Akyıl, D. and Konuk, M. (2012). Determination of mutagenic potencies of aqueous extracts of *Thermopsis turcica* by Ames test. *Turkish Journal of Biology*, **36**: 85-92

DİĞER MAKALE

1. Korcan, S.E., Özkara, A., Akyıl, D. and Cığerci I.H. Konuk M. Farklı fungus cinslerinde endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin incelenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi*, **6(1)**: 279-286.

KONGRE, KONFERANS

1. Korcan, S.E., Özkara, A., Akyıl, D., Cığerci, I.H. ve Konuk, M. (2006). Afyonkarahisar İlinin Havasal Mikoflorasında Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası/Aydın, 26-30 Haziran 2006.
2. Cığerci, I.H., Akyıl, D., Özkara, A., Korcan, S.E. ve Konuk, M. (2006). Akarçay (Afyonkarahisar) Suyunun Mutajenik Özelliklerinin Allium Test ile Belirlenmesi. 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Kuşadası/Aydın, 26-30 Haziran 2006.

3. Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S.F. ve Konuk, M. (2010). Afyon Şeker Fabrikası Atık Suyunun *Hordeum vulgare* L. Çimlenme Yüzdesi, Kök Ucu Uzunluğu ve Mitotik İndeks Üzerine Olan Etkisi. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, 21-25 Haziran.
4. Özkara, A. Akyıl, D., Avaz, S., Korcan, E., Kargıoğlu, M. and Konuk, M., Bazı *Limonium* (L. *globuliferum*, L. *effusum*, L. *lilacinum*, L. *iconicum*, L. *gmelinii*) Türlerinin Antifungal Aktivitesinin Saptanması. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 26-29 Ekim 2010.
5. Erdoğan S.F., Akyıl D., Özkara A., Korcan S. E. ve Konuk M, Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların Mikrobiyal Biodegradasyonu, 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 26-29 Ekim 2010.

ARAŞTIRMA PROJESİ

1. Konuk, M., Akyıl, D., Liman, R. ve Özkara, A. (2006). Farklı Tipteki Fungusitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma, AKÜ BAP Komisyonluğu, Proje No: 051.FENED.01 (tamamlandı).
2. Konuk, M., Liman, R., Akyıl, D. ve Eren, Y. (2009). Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması, AKÜ BAP Komisyonluğu, Proje No:07.FENED.023 (tamamlandı).
3. Konuk, M., Liman, R., Akyıl, D. ve Eren, Y. (2009). *Limonium* Bitki Ekstraktlarının Muhtemel Mutajenik Özelliklerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemi ile Araştırılması, AKÜ BAP Komisyonluğu, Proje No:09.FENED.17 (tamamlandı).
4. Konuk, M., ve Akyıl, D. (2011). Bazı Pestisitlerin Mutajenite ve Genotoksisitelerinin Belirlenmesi, AKÜ BAP Komisyonluğu, Proje No:10.FENED.09 (devam ediyor).