

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PYRIPROXYFEN'İN İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HAVVA BUĞDA
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ADYAMAN, 2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PYRIPROXYFEN'İN İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Havva BUĞDA
Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Yıl : 2022, Sayfa sayısı: 51

Jüri : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Doç. Dr. Muhsin AYDIN

Bu çalışmada pyriproxyfen'in (PPX) *in vitro* insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkisi incelenmiştir. Sağlıklı, sigara kullanmayan, genç iki erkek iki kadından alınan kan ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Genotoksik ve sitotoksik etki kromozom anormallliği ve mikronükleus yöntemleri ile çalışılmıştır. PPX ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde tüm konsantrasyonlarda ve muamele sürelerinde kromozom anormallliği (KA) ve anormal hücre (AH) yüzdeleri ile mikronükleus (MN) ve mikronükleuslu binükleer hücre (MNBN) frekansları gibi incelenen tüm parametrelerde istatistiksel olarak önemli artışlar kaydedilmiştir. 24 saatlik muamele süresinde MN ve MNBN frekansında görülen artışın doza bağlı olduğu belirlenmiştir. PPX, tüm doz ve sürelerde NBI'ni önemli derecede düşürmüştür. PPX ile muamele edilen hücrelerde MI de düşmüş fakat bu düşüş istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır. Yapılan analizlerde *in vitro* insan periferik lenfositlerinde PPX'in genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pyriproxyfen, kromozom anormallliği, mikronükleus, genotoksisite

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECT OF PYRIPROXYFEN IN HUMAN LYMPHOCYTES

Havva BUĞDA
Adıyaman University
Institute of Graduate Education
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Year : 2022, Pages: 51

Jury : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Assoc. Prof. Dr. Muhsin AYDIN

In this study, the genotoxic and cytotoxic effects of pyriproxyfen (PPX) were investigated in human peripheral lymphocytes *in vitro*. The study was carried out with blood taken from young, healthy, non-smoker, two men and two women. The chromosome abnormality and micronucleus methods were used to detect genotoxic and cytotoxic effects. Statistically significant increases were noted in all parameters studied, such as chromosomal aberration (CA) and abnormal cell (AH) percentages, and micronucleus (MN) and micronucleated binuclear cell (MNBN) frequencies in human peripheral lymphocytes treated with PPX at all concentrations and treatment times. It was determined that the increase in MN and MNBN frequencies during the treatment period was dose-related. PPX significantly decreased NBI at all doses and times. MI also decreased in cells treated with PPX, but this decrease was not statistically significant. As a result, it was determined that PPX has genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral lymphocytes *in vitro*.

Key Words: Pyriproxyfen, chromosome aberration, micronucleus, genotoxicity

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FEFYL/2021-0001 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Pyriproxyfen’in insan lenfositlerinde genotoksik etkisinin araştırılması” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Havva BUĞDA

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na teşekkür ederim.

Yardımlarından dolayı Biyoloji Bölümü Doktora öğrencisi Biolog Banu GÜVEN EZER'e ve Lisans öğrencisi Özlem TÜRHAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her daim yanımda olan babam Mehmet BUĞDA'ya ve annem Rahime BUĞDA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Projemizi maddi yönden destekleyen Adıyaman Üniversitesi BAP personellerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
1.1. Larvasitler ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	4
1.2. Pyriproxyfen (PPX) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	5
3. MATERYAL ve METOD	8
1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	8
1.3.1. Kimyasal Maddeler	8
1.3.1.1. Kromozom Medyumu.....	8
1.3.1.2. Pyriproxyfen (PPX)	9
1.3.1.3. Kolşisin	10
1.3.1.4. Hipotonik Eriyik (KCI).....	10
1.3.1.5. Sitokalsin B	11
1.3.1.6. Fiksatif	11
1.3.1.7. Giemsa	12
1.3.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	12
1.3.1.9. Entellan	12
1.3.1.10. Nitrik Asit (HNO ₃).....	12
1.3.1.11. Mitomycin C (MMC).....	12
1.3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	13
1.3.2.1. Santrifüj	13
1.3.2.2. Mikroskop	13
1.3.2.3. İnkübatör	13

1.3.2.4.	Steril kabin.....	14
1.3.2.5.	Hassas Terazı	14
1.4.	Lamların Temizlenmesi.....	14
1.5.	Genotoksisite testleri	14
1.5.1.	Kromozom Anormallığı (KA) yöntemi	14
1.5.2.	Mikronukleus (MN) Yöntemi	17
1.5.3.	İstatistiksel Analiz.....	19
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	21
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	29
	KAYNAKLAR	30
	KİŞİSEL BİLGİLER.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 4.1 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri ile anormal hücre yüzdesi**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Çizelge 4.2 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesi ..**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Çizelge 4.3 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MI ve NBI frekansları **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 PPX'nin açık formülü	9
Şekil 3.2 Kolşisin açık formülü.....	10
Şekil 3.3 Cytochalsin B açık formülü	11
Şekil 4.1 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde CA (A) ve AH (B) yüzdeleri.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.2 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde MN yüzdesi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.3 Pyriproxyfen ile 24 saat muamele edilen insan lenfositlerinde mikronükleus (A) ve mikronükleuslu binükleer hücre (B) oranının doz etki ilişkisi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.4 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde MI (A) ve NBI (B) yüzdeleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AH	: Anormal Hücre Yüzdesi
PPX	: Pyriproxyfen
JH	: Juvenil Hormon
ZIKV	: Zika virüsü
VSV	: Veziküler somatit virüsü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
HNO₃	: Nitrik Asit
ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature
(Uluslararası	
	İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
KA	: Kromozom Anormallikleri
KCl	: Potasyum Klorür
mg	: Miligram
MI	: Mitotik İndeks
mL	: Mililitre
MN	: Mikronükleus
NaCl	: Sodyum Klorür
NBI	: Nukleer Bölünme İndeksi
LC₅₀	: Letal Doz Konsantrasyonu
rpm	: Revolution Per Minute (devir/dakika)
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol
dk	: Dakika

1. GİRİŞ

Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da bunların zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlara verilen genel addır. M.Ö. 1200 yılından beri doğal bileşiklerin pestisit amacıyla kullanılmaya başlandığı rapor edilmiştir [1]. Yüzyılın başından bu yana da zirai mücadelede pestisitler hastalık taşıyıcılarını kontrol ederek ve istenmeyen böcekleri yok ederek besin üretimini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır [2]. Pestisitlerin yaygın kullanımı toprak, su, hava ve besinde kirlilikle sonuçlandığı, pestisitle yüklü yüzeylerden temas ile besinlerin kontamine olduğu ve bu yolla, yetişkin ve çocukların diyet yoluyla pestisitlere maruz kalmalarının potansiyel olarak arttığı bildirilmiştir [3].

Pestisitler, etkili olduğu canlı grubuna göre herbisitler, fungusitler, rodentisitler ve insektisitler (organofosfatlı pestisitler, karbamatlı pestisitler, organoklorinli pestisitler ve piretroitler) olmak üzere 4 ana sınıfa ayrılmaktadırlar [4].

Yıllar boyunca kullanılan pestisitlerin başta kanser olmak üzere birçok canlıda mutajenik etki gösterdiği rapor edilmiştir [5-7]. Bununla birlikte pestisitlerin farklı canlılarda kromozom anormalliklerine neden oldukları [8-11] ve bazı pestisitlerin rat dokularında çeşitli biyomarkırları etkilediği [12, 13] bildirilmiştir.

Pestisitlerin insan sağlığı açısından riskli olup olmadıklarının saptanması ve özellikle mutasyon oluşturma risklerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin mutajen olup olmadığının belirlenmesi, kısa sürede sonuç verebilen bazı genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bu testler kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinmektedir. Bu testler arasında kromozom aberasyonu (KA) (Chromosome Aberration=CA), [14-16] ve mikronükleus (MN) [17, 18] testleri sayılmaktadır.

Kromozom aberasyonu oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir [19-22]. Yüksek KA frekansı, KA artışını başlatan sebebe bakılmaksızın yüksek kanser riskinin bir göstergesi olabilir, çünkü KA oluşumunun

DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından da kaynaklanabileceği bildirilmiştir [23].

Mikronükleus, asentrik kromozom ya da kromatid kırıklarından ve bir ya da birkaç kromozom ya da kromatidin anafazda geri kalmasından dolayı (kalgın kromozom) telofazda oluşan esas nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır [24]. Ayrıca multipolar anafaz ve telofaz da MN oluşumuna sebep olmaktadır [25]. MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayırlanamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır [26]. Böylece MN testi ile hem klastojenik hem de aneujenik etkiler belirlenebilmektedir [27, 28]. Yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur [29-31]. Ayrıca Fenech ve ark. [32]'nin uluslararası işbirliği ile yaptıkları bir araştırmada insanlarda MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir.

Pyriproxyfen (PPX), çeşitli böceklerle karşı etkili olduğu bulunan bir insektisittir [33]. İlk defa 1996 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde pamuklarda beyazsineğe karşı kullanılmıştır. Daha sonra beyazsinekle birlikte diğer tarım ürünleri zararlarına karşı da etkili olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda ev hayvanlarında pire kontrolü için, iç ve dış karıncaları ve hamam böceklerini öldürmek için de bir önleme olarak kullanılabileceğine karar verilmiştir [34].

Pyriproxyfen juvenil bir hormon analogudur ve böcek büyüme düzenleyicisidir (National Pesticide Infor. Center, <http://npic.orst.edu/factsheets/pyriprogen.html>). PPX böceklerde juvenil hormon aktivitesini taklit ederek endokrin sistemini bozmaktadır [35]. Dolayısıyla larvaların yetişkinliğe dönüşmesini engelleyerek böceklerin üremesini bloke etmektedir.

PPX larvasit özelliğinden dolayı sivrisinek larvalarının çoğalmasını engellemek amacıyla 2014 yılında Brezilya'da su kaynaklarında kullanılmaya başlanmıştır. Hemen ardından bu sefer Brezilya'da embriyolarda mikrosefali görülmesinin zika virüsünden ziyade bu larvasitin sulara karışımından kaynaklandığı tartışmalarını

alevlendirmiştir. Fakat yapılan bir çok çalışmada PPX ile mikrosefali arasında bir korelasyon bulunamamıştır [36-40].

PPX toksisitesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Maharajan ve ark. [41] yaptıkları çalışmalarda PPX'in Zebra balığı embriyolarının erken gelişim dönemlerinde çeşitli biyokimyasal parametreleri etkileyerek olumsuz etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Alves ve ark. [42] PPX'in *Allium cepa*'da tüm konsantrasyonlarda kromozomal hasarlara neden olduğu ve *Saccharomyces cerevisiae*'de ise oksidatif hasar oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Raporlarında bu insektisidin hem sağlık açısından hem de çevre açısından risk oluşturduğu sonucuna varılmışlardır. Luckmann ve ark. [43] da PPX'in tavuk (*Gallus domesticus*) embriyolarında DNA çift iplik kırıklarını ve apoptozisi indüklediğini bildirmişlerdir. Shahid ve ark. [44] PPX'in hayvanlarda ve insanlarda doku ve organ ağırlıklarını azalttığını ve histopatolojik olarak incelenen dokularda önemli deformasyonlara sebep olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar sonuç olarak bu insektisidin testis atrofisine neden olarak spermatogenez yolağını etkilediği, insanlarda da üreme anormalliklerine sebep olabileceği sonucuna varmışlardır. Liu ve ark. [45] PPX ve onun A ve B metabolitlerinin rat hepatositlerinde apoptoz ve DNA hasarını indüklediğini ve hatta metabolitlerinin kendisinden daha yüksek bir toksisite gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca yapılan birçok çalışmada PPX'in sularda birikerek toksik etkiler gösterdiği [35], canlılarda bazı enzim aktivitelerini ve tiroid hormon düzeylerini artırdığı ve aynı şekilde kalp ritmini indüklediği [46] saptanmıştır.

Görüldüğü gibi 1996 yılından beri kullanılan PPX insektisidinin genotoksik etkileri ile ilgili *A. cepa* ve *Gallus domesticus* ile yapılan genotoksisite çalışmaları dışında hiçbir çalışma gerçekleştirilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı PPX insektisidinin insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği ve mikronükleus testleri ile genotoksik etkisinin saptanmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Doğal bileşiklerin pestisit amacıyla kullanılmaya başlandığı (M.Ö. 1200 yıl) [1] tarihten itibaren sentetik pestisitlerin icadı ve kullanılması da dikkate alındığında çok farklı isim altında pestisit kullanımının varlığı bir gerçektir. Özellikle son yıllarda sivrisineklere karşı yeni insektisit taleplerinin hızla artması nedeniyle larvasit kullanılması popülerlik kazanmaya başlamıştır. Bu nedenle bu bölümde PPX ile aynı etkiye sahip larvasitlerin genotoksik etkileri incelenecektir.

1.1. Larvasitler ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Piau ve ark. [47], *Aedes aegypti* sivrisineğine karşı larvasit özelliklere sahip birçok kinon bazlı bileşikleri incelemişlerdir. Araştırmacılar taranan birçok molekül arasında yüksek larvasit etkisine sahip olan 2-methylantraquinone'un zebra balığında mikronükleusu indüklediği ve comet assay deneyinde negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Fakat lactate dehydrogenase ve Glutathione-S-Transferase enzimlerini indükleyerek toksikolojik etki oluşturmuştur.

Aciole ve ark. [48] tarafından yapılan çalışmada, *Piper aduncum*'dan ekstrakte edilen bir fenilpropanoid olan dillapiol gibi bitki ekstraktlarından türetilen larvasitler araştırılmıştır. Aynı zamanda spinosad gibi mikroorganizmalardan fermentasyon işleminden türetilen spinosin A ve D larvasitlerinin etkisi de araştırılmıştır. Larvasitlerin etkisi *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda dillapiol ve spinosad ile muamele edilen *Drosophilalarda* her iki bileşiğin mutajenik olduğu hatta spinosadın dillapiolden 14 kat daha fazla mutajenik etki gösterdiği gözlenmiştir.

Vani ve ark. [49] larvasit temephosun albino farelerde reproduktif performansı, embriyofetal gelişimi ve DNA bütünlüğü üzerine olası etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada larvasitin 0,0043 mg/kg dozunda biyometrik ve reproduktif parametreleri değiştirmediğini, gebe farelerde fetüs büyüklüğünü artırmakla birlikte fetüslerde herhangi bir malformasyona neden olmadığını rapor etmişlerdir. Larvasit dozunun 10 kat artırılması durumunda ise (0,043 mg/kg) embriyoda iskelet sistemi

dışında bazı anormal gelişimlere neden olmuştur. Mikronükleus frekansının ise sadece yüksek dozda indüklendiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre araştırmacılar temephosun düşük genotoksik ve teratojenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Pereira ve ark. [50] nörotoksik insektisit sınıfına giren spinosadın farklı subletal konsantrasyonlarının genotoksik etkilerini iki balık türünde (*Poecilia reticulata* ve *Xiphophorus maculatus*) araştırdıkları çalışmalarında insektisidin yüksek dozlarda (12,6 mg/L ve 25,3 mg/L) mikronükleus frekansını artırarak genotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Mendonça ve ark. [51] spinosadın genotoksik etkisini hem *Tradescantia pallida*'da mikronükleus testi ve hem de *Drosophila melanogaster*'de SMART testi ile araştırmışlardır. Kimyasalın *T. pallida*'da mikronükleus frekansını indüklediği fakat *Drosophila* SMART testinde mutajenik olmadığı saptanmıştır. *Drosophila*da spinosadın CYP6A2 (cytochrome P450) ile metabolize olması durumunda çok yüksek bir toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Agri-Safe ve deltamethrin larvasitlerin ratlarda genotoksik etkisinin incelendiği çalışmada her iki kimyasalın genotoksik risk oluşturdıkları ve hepatotoksik etkiye sebep oldukları fakat sadece deltamethrinin ratlarda oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir [52].

1.2. Pyriproxyfen (PPX) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

PPX'nin kimyasal yapısı böcek juvenil hormonunu (JH) taklit eder, yağda çözünür ve hormon yollarında ciddi bozulmalara neden olarak böceklerin gelişimini ve üremesini, böcek davranışını, feromon üretimini ve ayrıca yetişkin morfogenezini etkilemektedir [53].

Larvasidal etkili insektisit olarak yeni kullanıma sunulan PPX ile ilgili genotoksisite çalışmaları sınırlı sayıdadır. Alves ve ark. [42] tarafından yapılan bir araştırmada PPX'in *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde tüm konsantrasyonlarda kromozomal hasarlara neden olarak genotoksik etki gösterdiğini ve hücre bölünmesini baskılayarak sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Luckmann ve ark. [43] PPX'in tavuk (*Gallus domesticus*) embriyolarında beyin gelişimini, DNA anormallliği ve apoptozis üzerine etkilerini incelemişlerdir. İki

subletal doz (0.01 mg/L and 10 mg/L) verilen embriyoların beyin gelişiminin engellendiği, DNA çift iplik kırıklarının ve apoptozisin indüklendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar PPX'in embriyolarda nöron gelişimi için güçlü bir stres etkeni olduğunu fakat nöron ve glial hücre sayısında herhangi bir değişiklik oluşturmadığını rapor etmişlerdir.

Başka bir çalışmada Maharajan ve ark. [41] PPX'in zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarında düşük dozlarda genotoksik olmadığını fakat 1,66 µg/mL dozunda DNA hasarlarına neden olduğunu ve apoptozisi indüklediğini saptamışlardır.

PPX genotoksitesisi hakkında bu sınırlı sayıdaki çalışmalara paralel olarak çeşitli canlılarda toksikolojik etkileri ile de sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. PPX larvasit özelliğinden dolayı sivrisinek larvalarının çoğalmasını engellemek amacıyla 2014 yılında Brezilya'da su kaynaklarında kullanılmaya başlanmasının hemen ardından Brezilya'da embriyolarda mikrosefali vakaları çoğalmaya başlamıştır. Bu da mikrosefali olgularının zika virüsünden ziyade bu larvasitin sulara karışımından kaynaklandığı tartışmalarını alevlendirmiştir. Fakat yapılan bir çok çalışmada PPX ile mikrosefali arasında bir korelasyon bulunamamıştır [36-40]. Takip eden yıllarda Maharajan ve ark. [41] PPX'in Zebra balığı embriyoları erken gelişim dönemlerinde çeşitli biyokimyasal parametreleri etkileyerek olumsuz etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Alves ve ark. [42] PPX'in toksik potansiyelini *Artemia salina*'da ve oksidatif hasar etkisini de *Saccharomyces cerevisiae*'da incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar PPX'in hem toksik hem de oksidatif etkiler gösterdiği, dolayısıyla insektisidin insan ve çevre sağlığı açısından risk oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Shahid ve ark. [44] PPX'in hayvanlarda ve insanlarda organ toksisitesine ve teratojenisiteye sebep olup olmadığını incelemişlerdir. Bu amaçla albino farelere 28 gün boyunca günlük 1200, 600, 320, 200, 100, 40, 20, 0 mg/kg/day dozlarını vermişlerdir. Süre sonunda testis dokusu, seminifer tüpleri ve leyding hücre değişimleri histopatolojik olarak incelenmiştir. İnsektisidin doku ve organ ağırlıklarını azalttığı histopatolojik olarak incelenen dokularda da önemli deformasyonlara sebep olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar sonuç olarak bu insektisidin testis atrofisine

neden olarak spermatogenez yolağını etkilediği, insanlarda da üreme anormalliklerine sebep olabileceği sonucuna varmışlardır.

Liu ve ark. [45] PPX'in toksikolojik etkisini rat karaciğerlerinde incelemişlerdir. İncelemeler sonucunda PPX ve onun A ve B metabolitlerinin rat hepatositlerinde apoptoz ve DNA hasarını indüklediğini ve hatta metabolitlerinin kendisinden daha yüksek bir toksisite gösterdiğini saptamışlardır.

Ayrıca yapılan birçok çalışmada PPX'in sularda birikerek toksik etkiler gösterdiği [35], canlılarda bazı enzim aktivitelerini ve tiroid hormon düzeylerini artırdığı ve aynı şekilde kalp ritmini indüklediği [46] saptanmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma etik bakımından Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (tarih:14.01.2021, sayı:2021/01-24).

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Pyriproxyfen (PPX)'in genotoksik etkisini incelemek için iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler Kromozom anormalliği (KA) ve Mikronükleus (MN) yöntemidir. Her iki yöntem de kısa süreli genotoksik yöntemlerdir. Bu iki yöntem kimyasalın etkisini kısa sürede anlamamızı sağlayan yöntemlerdir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada PPX'in insan lenfositlerindeki genotoksik etkisine bakılmıştır. Bu araştırma sigara kullanmayan, sağlıklı, gönüllü ve konu ile ilgili bilgilendirilmiş iki erkek iki bayan olmak üzere dört kişiden ayrı ayrı alınan 2 ml kan ile gerçekleştirilmiştir. Donörlerin yaşları 25-30 arasında değişmektedir.

1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

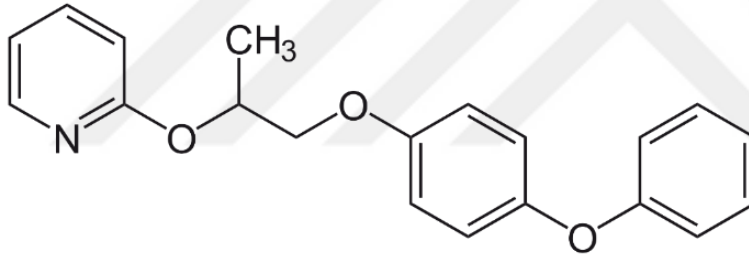
Genotoksisite testlerinin gerçekleştirilebilmesi için birçok kimyasal madde ve birçok deney ekipmanları kullanılmıştır.

1.3.1. Kimyasal Maddeler**1.3.1.1. Kromozom Medyumu**

Kromozom medyumu olarak Gibco firmasının ürettiği PB-Max besi yeri (cat. no. 12552-013), lenfosit hücrelerimizin kültüre edilmesi için kullanılmıştır. PB-Max içerik olarak Fetal Bovine Serum, L-glutamine, Gentamicin sulfate ve Phytohemagglutinininden oluşmaktadır. Bu besi yeri steril edilmiş 4 ml'lik ependorf tüplerine 2.5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. İlk defa bu çalışmada hücre kültürü için kültür tüpleri yerine ependorf tüpleri kullanılmıştır. Besi yerleri hücrelerimizin canlılığını devam ettirecek içeriklerden oluşmalıdır.

1.3.1.2. Pyriproxyfen (PPX)

Pyriproxyfen, böceklerde doğal bir hormonu taklit eder ve büyümelerini bozar. Çoğunlukla genç böcekleri ve yumurtaları etkileyen bir tür böcek büyüme düzenleyicisidir. PPX pire, hamamböceği, keneler, karıncalar, halı böcekleri ve sivrisinekler dahil olmak üzere birçok böcek türünü etkiler. 1995'ten beri Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından pestisitlerde kullanılmak üzere tescil edilmiştir. PPX, 300'den fazla kayıtlı pestisit ürününde bulunur. Bunlar, evlerde, çimlerde ve tarımda birçok gıda ürününde kullanılmaktadır. PPX, pire ve keneleri kontrol etmek için doğrudan evcil hayvanlar üzerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. PPX, sıvı, granül, toz ve pelet dahil olmak üzere birçok biçimde satılmaktadır [54]. PPX'nin açık formülü (Şekil 3.1) ve diğer özellikleri aşağıda görülmektedir [34].



Şekil 3.1. PPX'nin açık formülü

IUPAC adları:4-Phenoxyphenyl (*R/S*)-2-(2-pyridyloxy)propyl ether

2-[1-(4-Phenoxyphenoxy)propan-2-yloxy]pyridine

Kimyasal Formül : C₂₀H₁₉NO₃**Molar Kütle** : 321.376 g·mol⁻¹**Yoğunluk** : 1.2 g/cm³**Erime Noktası** : 48–50 °C (118–122 °F; 321–323 K)**Kaynama Noktası** : 318 °C (604 °F; 591 K)**Sudaki Çözünürlüğü:** 0.367 mg/L

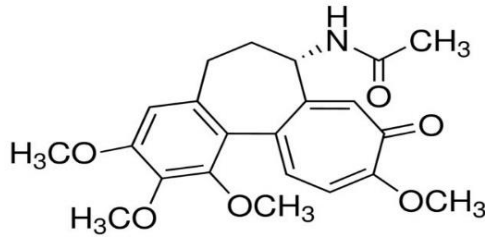
1.3.1.3. Kolşisin

Kolşisin mikrotübül oluşumunu engeller ve böylece iğ ipliklerinin işlevi de ortadan kalkar. Mitoz bölünmenin anafaz safhasında sentromerler çözülemediği için kromatidler kutuplara hareket edemezler. Kromozomların metafaz safhasında tutulması ve lam üzerinde dağılmasının sağlanması amacıyla kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Kimyasal adı (IUPAC): N-[(7 S)-1, 2, 3, 10-tetramethoxy-9-oxo-5, 6, 7, 9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamide

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Açık formülü:



Şekil 3.2 Kolşisin açık formülü

Molekül ağırlığı: 399.4 g/mol

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

CAS No: 64-86-8

1.3.1.4. Hipotonik Eriyik (KCI)

Hipotonik eriyik olarak % 0,45'lik KCI kullanılmıştır. KCI stok olarak hazırlanır ve cam kapta buzdolabına saklanır. Deneylerden 2 saat önce alınarak 37°C'de inkübatörde tutularak ısınması sağlanır. Hipotonik eriyik, Kromozom Anormallliği (KA) testinde lenfositlerin şişirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Şişmiş lenfositler lam üzerine damlatıldığında patlar ve kromozomlar dağılarak inceleme için iyi bir ortam oluştururlar.

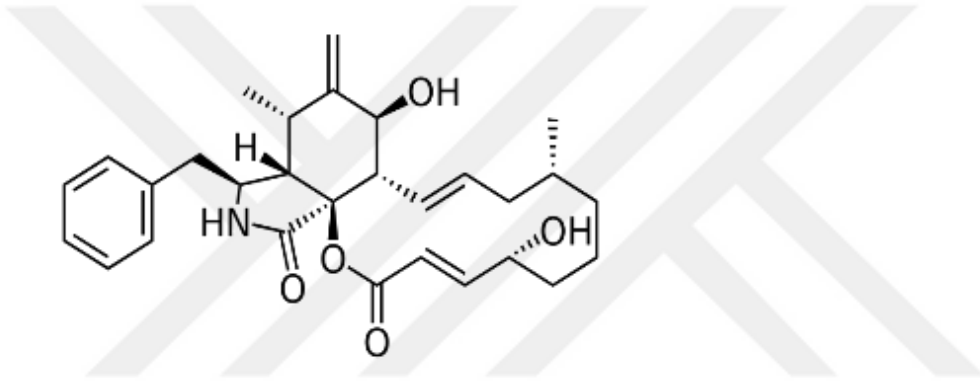
1.3.1.5. Sitokalsin B

Mikronukleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak için kullanılmıştır (Sigma, C6762). 6 µg/ml olacak şekilde %50 etil alkol ile hazırlanmıştır (Şekil 3.3).

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık formülü:



Şekil 3.3 Cytochalasin B açık formülü

Molekül ağırlığı: 479.6 g/mol

Erime noktası: 218-223°C

CAS No: 14930-96-2

1.3.1.6. Fiksatif

Bu çalışmada KA ve MN yöntemleri için iki farklı fiksatif hazırlanmıştır. KA yöntemi için fiksatif metil alkol ve asetik asit karışımlarından 3/1 oranında hazırlanmıştır. MN yöntemi için ise fiksatif metil alkol ve asetik asit karışımlarından 5/1 oranında hazırlanmıştır. Ayrıca MN yöntemi için önce 5/1 oranında hazırlanan fiksatifin % 0.9 NaCl ile 1/1 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen fiksatif kullanılmıştır. Fiksatifler deneyde kullanılmadan iki saat önce taze olarak hazırlanır ve buzdolabına saklanır (+4°C).

1.3.1.7. Giemsa

Preparatları boyamak için kullanılan giemsa solüsyonu Sorensen tamponu içerisinde %5'lik olarak hazırlanmıştır.

1.3.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Bu tampon lamları boyamak için kullanılan %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu tampon A ve B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanır ve ayrı ayrı saklanır. Tampon A, 11.34 gr KH_2PO_4 kimyasalının 250 ml saf su içinde eritilmesi ($\text{pH}=4.8$), Tampon B ise 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ kimyasalının 250 ml saf su içinde eritilmesi ($\text{pH}=9.3$) sonucu hazırlanmıştır. %5'lik giemsa hazırlanırken her iki tampondan ve giemsaden 5'er ml alınır ve üzerlerine 85 ml saf su ilave edilir (toplam 100 ml). Süzülür ve kullanılır.

1.3.1.9. Entellan

Entellan lam-lamel yapıştırılmasında kullanılan renksiz bir yapıştırıcıdır (Merck, Cat. No. 7961).

1.3.1.10. Nitrik Asit (HNO_3)

1 N çözelti şeklinde hazırlanan ve cam şişede saklanan nitrik asit lamları temizlemek için kullanılmıştır. Tekrar tekrar kullanılabilir (Merck, Cat. No.100456).

1.3.1.11. Mitomycin C (MMC)

Pozitif mutajen bir kimyasaldır. Hem KA ve hem de MN yöntemleri için kullanılmıştır. Deneylerimizde 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarında kullanılmıştır. 2 mg'lık flakonlarda temin edilen MMC (Kyowa,

Hakko, Japan) steril ortamda 0.2 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmış ve birer ml olacak şekilde steril ependorf tüplerine bölüştürülerek -20°C’de saklanmıştır. Bu şekilde saklanan MMC solüsyonunun bozulmadan ve mutajenik özelliğini yitirmeden 5 yıl boyunca saklanabildiği görülmüştür.

1.3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

1.3.2.1. Santrifüj

Devir sayısı ve süresi ayarlanabilen kültürden çıkardığımız hücrelerin dibe çökmesini sağlayan araçtır. Böylece çalışmamızın devamlılığını sağlayacak olan hücreler elde edilmiş olur ve işimize yaramayan süpernatant tüplerden uzaklaştırılmış olur. Çalışmamızda 16 tüp kapasiteli, açılabilir başlık ve zaman ayarlayıcı özelliklerine sahip NÜVE NF 400 marka santrifüj kullanılmıştır.

1.3.2.2. Mikroskop

Işık mikroskobu preparatları incelemek için kullanılmıştır. Bu çalışmada, X ve Y düzlemsel koordinatlara sahip, immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskopları kullanılmıştır.

1.3.2.3. İnkübatör

37°C±1 hassasiyetinde olan inkübatör (NÜVE EN 120) hücrelerin besiyerinde canlılıklarının devamı ve mitoz bölünmenin gerçekleşmesi amacıyla kullanılmıştır. Hücreler besiyeri içinde 37°C ısıya sahip inkübatörde 72 saat için inkübe edilmişlerdir.

1.3.2.4. Steril kabin

Besiyerlerinin paylaştırılması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi esnasında steril bir ortam sağlanması amacıyla kullanılmıştır. ESCO CLASS II BSC marka flow kabin UV ampulü bulunan ve %99,99 partikül tutma özellikli filtreye sahiptir.

1.3.2.5. Hassas Terazi

0,0001 g hassasiyetindeki OHAUS PIONEER marka terazi her türlü tartım işlerinin yapılmasında kullanılmıştır.

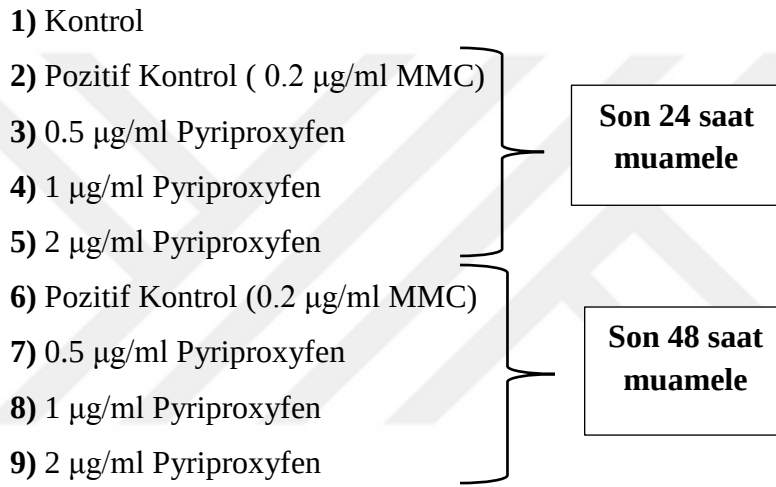
1.4. Lamların Temizlenmesi

1 N nitrik asit lam temizleme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Kültür süresinin bitiminden iki gün önce lamlar şaleye dizilir ve üzerlerini örtecek kadar temizleme çözeltisi eklenir. Şalenin ağzı kapalı olarak 24 saat bekletilen lamlar süre bitiminde yarım saat akan çeşme suyunda tutulur, 3 defa saf sudan geçirilir ve şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanır. Lamlar soğuk olarak kullanılır.

1.5. Genotoksisite testleri**1.5.1. Kromozom Anormalliği (KA) yöntemi**

Kimyasalların etkisi ile DNA'da çeşitli hasarlar oluşabilir ve bu hasarlar ciddi sorunlara yol açabilir. Bu hasarlar DNA zincir kırıkları şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu kırık zincirlerin sebebi kimyasalın etkisi ile ortaya çıkmıştır ve eğer onarılamamış veya yanlış onarılmış ise bu kırıklar görülebilir. Kromozom anormalliklerini incelemek için, *in vitro* KA testi periferik lenfosit kültürlerinde, *in vivo* KA testi ise genellikle hayvan kemik iliği hücrelerinde gerçekleştirilir.

Bu çalışmada modifiye edilmiş genotoksisite metodları kullanılmıştır [55-57]. Steril endorf tüplerine 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılan besi yerlerine her donörden alınan kan steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) [58] olacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat için inkübe edilmiştir. PPX suda çözülmüş ve ön çalışma ile PPX'in non toksik dozları saptanmıştır (0.5, 1 ve 2 $\mu\text{g/ml}$). Hücreler bu dozlarla 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Her donör için PPX'in etkisini incelemek amacıyla aşağıda gösterildiği gibi 9 tüp hazırlanmıştır. Bu tüplerin sıralanışı şu şekildedir:



Kültür süresinin başlamasından 70 saat sonra tüm tüplere 0.06 $\mu\text{g/ml}$ kolşisin eklenmiş ve hücrelerin inkübatörde 2 saat boyunca kolşisin ile muamele olmaları sağlanmıştır. Kolşisin muamelesi ile iğ iplikleri inhibe edilerek hücrelerin metafazda durdurulması ve kromozomların metafaz plakları şeklinde dağılarak hatasız bir şekilde kolaylıkla incelenmesi sağlanmıştır. Kolşisin ilavesini takiben her tüpe 8 ml olacak şekilde hipotonik eriyik (% 0.4 KCl) buzdolabından alınarak inkübatöre koyulmuş ve fiksatif hazırlanarak (metanol/asetik asit, 3/1) buzdolabına alınmıştır. Daha önceden 1 N nitrik asit içinde bekletilen lamalar da anlatıldığı şekilde yıkanarak saf su içinde buzdolabına alınmıştır. İnkübasyon boyunca hücrelerin muamelesi de dahil tüm işlemler 4 ml'lik endorf tüpleri ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerimizin kültür süresi (72 saat) bittikten sonra hücre süspansiyonu temiz nonsteril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve supernatant (üst sıvı) atılmıştır. Dipte kalan sıvı iyice karıştırıldıktan sonra inkübatörde bulunan hipotonik

solüsyon alınarak yavaş bir şekilde ve karıştırarak tüplere damlatılmıştır (8 ml). Hücreler 37°C'deki inkübatörde hipotonik solüsyon ile 8 dk muamele edilmiştir. Sürenin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve dipte kalan hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Karıştırma işleminden sonra azar azar ve karıştırarak soğuk fiksatif eklenmiştir (8 ml). Bütün tüplere fiksatif eklendikten sonra tüpler oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Oda sıcaklığındaki beklemeden sonra tüpler tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılmış ve tekrar aynı şekilde fiksatif ilave edilmiştir. Fiksatif muamelesi 3 defa tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüplerde yaklaşık 0.5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve hücreler homojen hale getirilerek preparat hazırlama işlemine geçilmiştir.

Pasteur pipeti ile daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine damlatma düzeneği aracılığıyla yaklaşık 30 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır.

Hazırlanan preparatlar yatay şekilde 24 saat havada kurutulmuş, Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemelere geçilmiştir.

Hazırlanmış preparatlardan incelenebilir şekilde iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre, kromozomal anormalliklerin saptanması için 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 [59]. İncelenen bu 100 hücre içinde toplam kromozom anormalliği ile anormal hücre yüzdeleri saptanmıştır.

PPX'in mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile aynı preparatlardan mitotik indeks de hesaplanmıştır. Bunun için her kişiye ait preparatlardan ve her doz için toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki

metafaz evresinde olan hücreler tespit edilerek kaydedilmiştir. Üç bin hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks tespit edilmiştir.

1.5.2. Mikronukleus (MN) Yöntemi

MN'ler genellikle hücre döngüsünü kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğ ipliklerindeki hatalardan, kinetokordan ve kromozomal hasarlardan oluşan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, hücre çekirdeğinden bağımsız, tam kromozom veya kromozom fragmanlarından oluşan küçük çekirdek görünümünde yapılardır. MN testi, mitoz bölünme sonucu oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanan genetik toksikoloji araştırmalarında yaygın kullanılan bir testtir. *In vitro* MN testinde, inkübasyona alınan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalsin-B maddesi ilave edilerek (bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan çift çekirdekli hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır) inkübasyon süresi sonunda kültürler prosedüre uygun olarak hasat edilmekte ve preparatlarda MN bulunduran çift çekirdekli hücrelerin oranı belirlenmektedir. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenmektedir. Bu test ile genellikle kemik iliğinde veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanmaktadır.

Mikronukleus sayısını saptamak için Fenech [60] ve Kirsch-Volders ve ark. [61] tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Alınan kandan kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla kan (0.2 ml) ekilmiştir [58]. Hücre kültürlerimiz $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat olacak şekilde inkübasyona alınmıştır. Her donör için 9 tüp kullanılmış, tüplerin sıralanışı ve muamele şekli KA yönteminde anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

PPX'in etkisini incelemek için, belirlenen dozlarda PPX kültür tüplerine ilave edilerek hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca PPX ile muamele edilmesi sağlanmıştır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültür bitimine 24 saat kala bütün tüplere 6 µg/ml sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma Cat. No. C6762) ilave edilmiştir. Ayrıca

24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak pozitif mutajen MMC kullanılmıştır (0.2 µg/ml). İnkübasyon boyunca hücrelerin muamelesi de dahil tüm işlemler 4 ml'lik ependorf tüpleri ile gerçekleştirilmiştir. Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde hücre süspansiyonu temiz nonsteril santrifüj tüplerine aktarılmış, kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş ve sonrasında süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, inkübatörde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik (KCI) ilave edilmiştir. Her tüpe 8 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler ağzı kapatılarak inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler 4 dk KCI ile 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Bu defa her tüpe 5 ml olacak şekilde 1:1 oranında soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 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 (metanol/asetik asit, 5/1). Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve hücre süspansiyonu daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine damlatılarak hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere yatay şekilde 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiş ve entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemelere geçilmiştir.

Hazırlanmış daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 iki nukleuslu (binükleer, BN) hücre

sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu (mikronükleuslu binükleer, MNBN) hücreler tespit edilmiştir. Ayrıca aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 tane hücre sayılmış ve bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların oranı tespit edilmiştir. Bu orandan yola çıkarak Nukleer Bölünme İndeksi (NBI) (Nuclear Division Index = NDI) hesaplanmıştır [60]. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\text{NBI} = (1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3 + 4 \times N_4) / 2000$$

N₁: 1 nukleuslu hücre sayısı

N₂: 2 nukleuslu hücre sayısı

N₃: 3 nukleuslu hücre sayısı

N₄: 4 nukleuslu hücre sayısı

n : Toplam hücre sayısı

MN sayısı saptanırken aşağıdaki kriterler uyuldu:

1-Hücreler iki nükleusa sahip olmalıdır.

2-Hücreler belirgin sitoplazması ile yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.

3-Nükleuslar belirgin nukleus zarı ile çevrili yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.

4-Mikronukleus çapı ana nukleusun 1/3'ü kadar ya da daha küçük olmalıdır.

5-MN'ler ana nükleus kadar boyanmış olmalıdır.

6-Yalnızca bir nukleus bölünmesi geçiren hücrelerde MN sayımı esas alınmalıdır.

7-MN'ler ana nukleustan bariz bir şekilde ayrılmış olmalı ya da MN sınırları ana nukleusun sınırlarından ayırt edilebilir olmalıdır.

1.5.3. İstatistiksel Analiz

Mikroskopik incelemeler sonucunda tüm donörler için ve kontrolleriyle birlikte tüm muamele grupları için KA, AH, MN ve MNBN hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen preparatlarda sitotoksiteyi belirlemek amacıyla MI ve NBI de hesaplanmıştır. Elde edilen KA, AH, MN, MNBN hücre yüzdeleri ile MI ve NBI yüzdeleri *t-testi* kullanılarak kontrolleriyle karşılaştırılmıştır. % 5 ve daha küçük P

değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca doz-etki ilişkisini saptamak amacıyla korelasyon ve regresyon testleri kullanılmış, korelasyon katsayısı saptanmış ve regresyon grafiği çizilmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Pyriproxyfen (PPX) insektisidinin insan periferik lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkileri çalışılmıştır. PPX toksik olmayan dozlarda *in vitro* kültür ortamında insan lenfositleri ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve insektisidin genotoksik etkileri kromozom anormallliği (CA), anormal hücre oluşumu (AH) ve mikronükleus (MI) parametreleri incelenerek belirlenmiştir. Ayrıca PPX'in sitotoksik etkisi de mitotik indeks (MI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) ile belirlenmiştir. Sonuçlar tablolar ve grafikler şeklinde sunulmuştur.

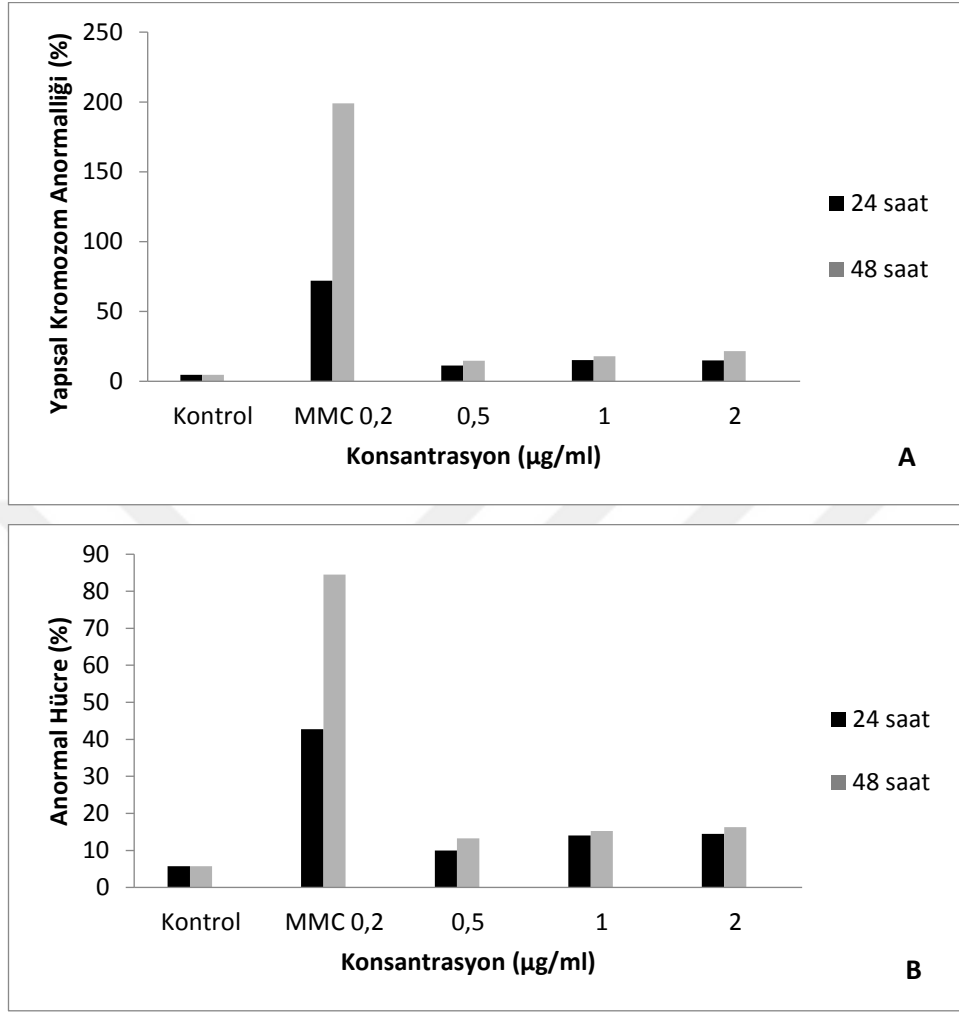
PPX ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan lenfositlerinde CA yüzdesi kontrol ile mukayese edildiğinde istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). Fakat PPX ile muamele edilen insan lenfositlerinde AH yüzdesi 24 saatlik muamele süresinde sadece en düşük dozda (0,5 µg/ml) önemli derecede artmazken diğer dozlarda ve 48 saatlik muamele süresinin tüm dozlarında önemli derecede artmıştır.

Çizelge.4.1 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde yapısal kromozom anormallikleri ile anormal hücre yüzdesi

Test maddesi	Süre (saat)	Konsant. (µg/ml)	Anormallik çeşitleri+		P	Yapısal KA±SE (%)	Anormal hücre±SE (%)
			B'	B''			
Kontrol	-	-	15	5	2	4,62±0,62	5,25±0,47
MMC	24	0.2	154	114	1	67,00±7,64	42,75±2,86
PPX	24	0,5	40	5		11,25±1,43*	10,00±1,87
“	24	1	46	15	2	15,25±0,62***	14,00±0,81**
“	24	2	52	8	1	15,00±1,68**	14,50±1,32**
MMC	48	0.2	322	474	3	199,00±16,19	84,50±5,79
PPX	48	0,5	51	8	2	14,75±1,65**	13,25±2,28*
“	48	1	58	14	3	18,00±2,41*	15,25±3,03*
“	48	2	45	41	3	21,50±1,65**	16,25±1,54**

+B', Kromatid tipi kırık; B'', kromozom tipi kırık; P, poliploidi

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: P≤0.05; **: P≤0.01; ***: P≤0.001



Şekil 4.1 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinde CA (A) ve AH (B) yüzdeleri

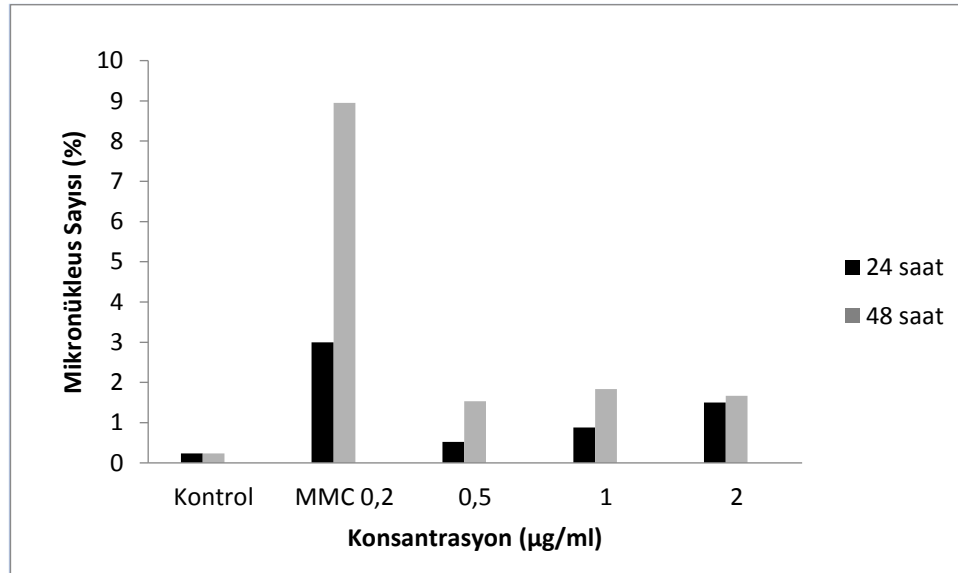
PPX'in 0,5, 1 ve 2 µg/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferall lenfositlerinden hazırlanan preparatlarda binükleer hücrelerin incelenmesi sonucu saptanan mikronükleus yüzdesi ile mikronükleus içeren binükleer hücrelerin yüzdesi çizelge 4.2'de verilmiştir. PPX insektisidinin tüm dozlarda ve her iki muamele süresinde mikronükleus frekansını istatistiksel bakımından önemli derecede artırdığı gözlenmiştir. Aynı şekilde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesinin de arttığı saptanmıştır (Şekil 4.2). Hem mikronükleus frekansının hem de mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesinin 24 saatlik muamele süresinde doza bağlı olarak arttığı

saptanırken (sırasıyla $r=0,999$, $p=0,023$ ve $r=0,998$, $p=0,039$), 48 saatlik muamele süresinde doz etki ilişkisi saptanamamıştır (Şekil 4.3).

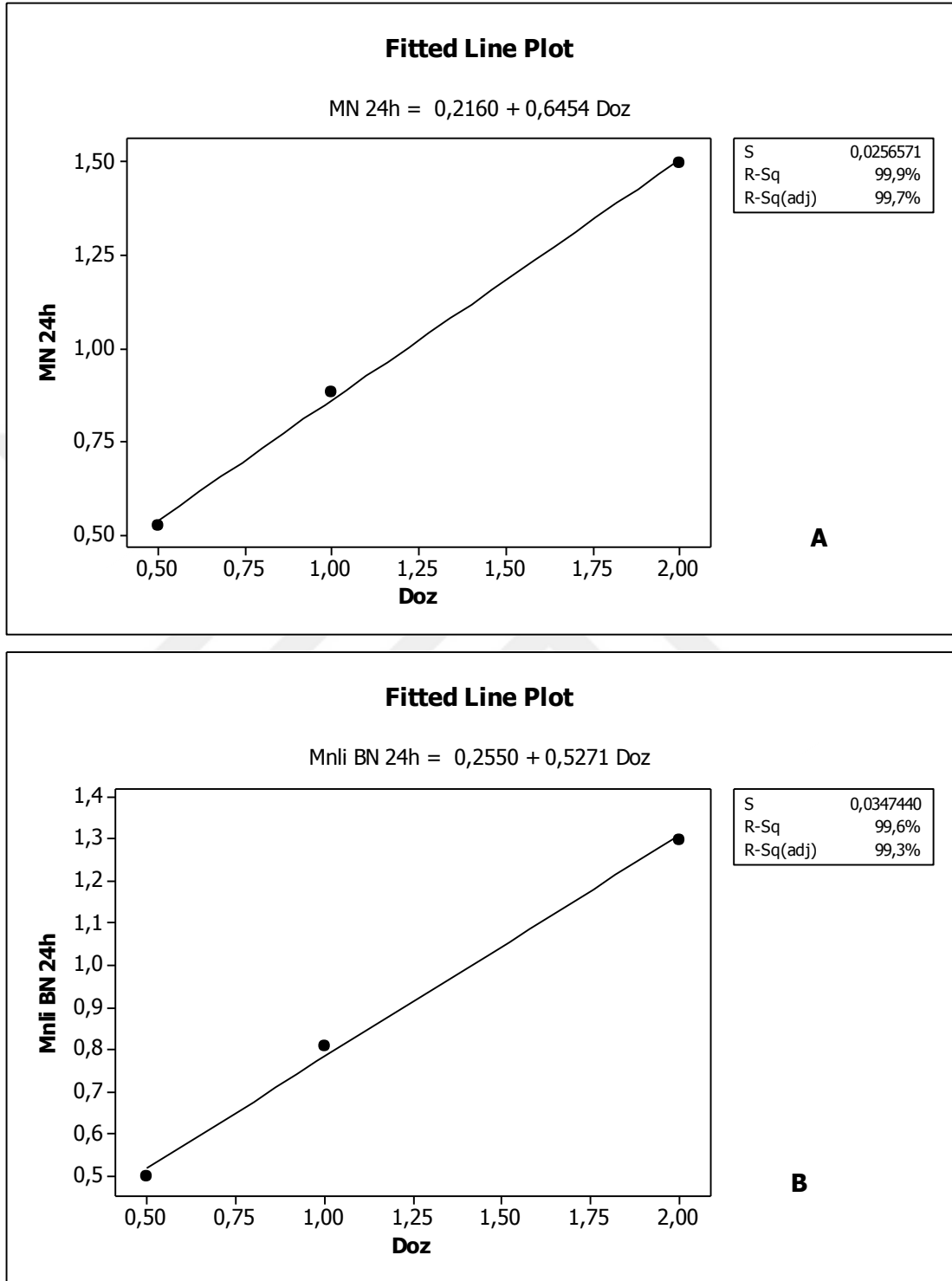
Çizelge 4.2 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronükleuslu binükleer hücre yüzdesi

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Mikronükleus sayısı (%) $\pm$ SE	Mikronükleus'lu binükleer hücre (%) $\pm$ SE
Kontrol	-	-	0,232 $\pm$ 0,06	0,200 $\pm$ 0,04
MMC	24	0.2	3,000 $\pm$ 0,10	2,637 $\pm$ 0,11
PPX	24	0,5	0,525 $\pm$ 0,04 **	0,500 $\pm$ 0,07 *
“	24	1	0,882 $\pm$ 0,04 ***	0,810 $\pm$ 0,06 **
“	24	2	1,500 $\pm$ 0,14 **	1,300 $\pm$ 0,07 **
MMC	48	0.2	8,952 $\pm$ 0,81	7,687 $\pm$ 0,85
PPX	48	0,5	1,532 $\pm$ 0,08 ***	1,432 $\pm$ 0,06 ***
“	48	1	1,832 $\pm$ 0,08 ***	1,700 $\pm$ 0,07 ***
“	48	2	1,667 $\pm$ 0,12 ***	1,532 $\pm$ 0,14 **

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: $P\leq 0,05$; **: $P\leq 0,01$; ***: $P\leq 0,001$



Şekil 4.2 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN yüzdesi



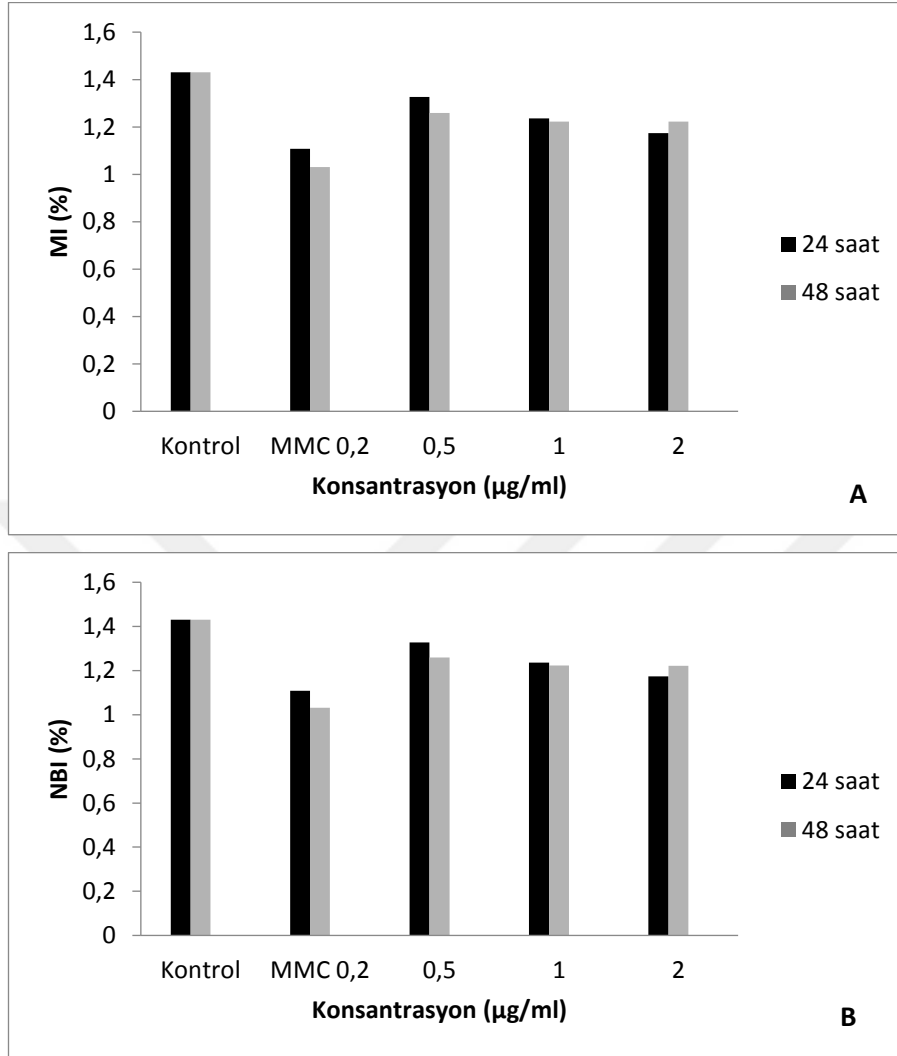
Şekil 4.3 Pyriproxyfen ile 24 saat muamele edilen insan lenfositlerinde mikronükleus (A) ve mikronükleuslu binükleer hücre (B) oranının doz etki ilişkisi

PPX insektisidinin insan periferel lenfositlerinde sitotoksik etkisi Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. PPX tüm dozlarda ve muamele sürelerinde mitotik indeksi kontrole nazaran düşürmüştür fakat bu etki istatistiksel bakımdan anlamlı bulunamamıştır. Hatta 48 saatlik PPX muamelesinde MI doza bağlı olarak düşmüştür fakat istatistiksel bakımından önemli bulunamamıştır ($r=0,981$, $p=0,12$). Halbuki, PPX tüm dozlarda ve hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde nükleer bölüme indeksini istatistiksel bakımından anlamlı derecede düşürmüştür. Fakat her ne kadar hem 24 saatlik hem de 48 saatlik muamele sürelerinde nükleer bölüme indeksindeki düşüş doza bağlı olarak azalsa da istatistiksel bakımından önemsiz bulunmuştur (sırasıyla $r=-0,956$, $p=0,19$ ve $r=-0,771$, $p=0,43$).

Çizelge 4.3 Değişik dozlarda Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MI ve NBI frekansları

Test maddesi	Süre (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	MI $\pm$ SE (%)	NBI $\pm$ SE
Kontrol	-	-	4,065 $\pm$ 0,53	1,430 $\pm$ 0,009
MMC	24	0.2	2,240 $\pm$ 0,26	1,108 $\pm$ 0,007
PPX	24	0,5	3,045 $\pm$ 0,48	1,327 $\pm$ 0,017 **
“	24	1	2,840 $\pm$ 0,35	1,236 $\pm$ 0,010 ***
“	24	2	3,090 $\pm$ 0,97	1,174 $\pm$ 0,004 ***
MMC	48	0.2	0,347 $\pm$ 0,19	1,031 $\pm$ 0,000
PPX	48	0,5	3,302 $\pm$ 0,41	1,259 $\pm$ 0,007 ***
“	48	1	3,045 $\pm$ 0,42	1,223 $\pm$ 0,014 ***
“	48	2	2,792 $\pm$ 0,50	1,222 $\pm$ 0,003 ***

Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli; *: $P\leq 0.05$; **: $P\leq 0.01$; ***: $P\leq 0.001$



Şekil 4.4 Pyriproxyfen ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MI (A) ve NBI (B) yüzdeleri

Çalışmamızda metod olarak *in vitro* kromozom anormalliği ile mikronükleus metodları materyal olarak da insan periferel lenfositleri kullanılmıştır. Bu yöntemler ksenobiyotik olarak adlandırılan kimyasal maddelerin kromozom sayı ve yapı anormalliklerini saptamamıza yaramaktadır. CA ve MN metodları olarak tanımlanan bu yöntemlerde fragment, translokasyon, kardeş kromatid birleşmesi, delesyon gibi her türlü yapısal kromozomal anormallikler ile aneuploidi veya poliploidi gibi sayısal anormallikler saptanabilmektedir [28, 61-64]. Aynı yöntemler ksenobiyotiklerin sitotoksik etkilerini de saptayabilmektedir.

Çalışmamızda PPX'in insan periferik lenfositlerinde hem CA yüzdesini hem de mikronükleus frekansını indüklediği saptanmıştır. Kromozom yapı anormallikleri klastojen denilen kimyasalların DNA molekülündeki şeker fosfat omurgasını oluşturan fosfodiester bağlarını koparması yoluyla meydana gelmektedir. Bunun sonucunda CA ve MN frekansları yükselir. Sayı anormallikleri ise aneijenlerin iğ zehiri gibi davranarak mitotik iğ ipliklerinin oluşumundan sorumlu olan mikrotübüllerin organizasyonunu engelleme yoluyla sayısal kromozomal anormalliklere neden olmaktadır. Çalışmamızda PPX klastojenik etki oluşturarak kromozom yapı anormalliklerine neden olmuş fakat aneijenik etki göstermeyerek sayısal kromozomal anormalliklerin oluşumuna neden olmamıştır.

Farklı hücre ve dokularda olsa bile CA oluşum mekanizması benzerdir. Ayrıca hücrelerdeki yüksek CA oranı DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından da kaynaklanabilmektedir [23]. Yüksek CA frekanslarının kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesinin göstergesi olması nedeniyle kanser riskinin de göstergesi olarak kabul edilmektedir [19-22]. Bu yönden bakıldığında hücrelerdeki kromozomal anormallik seviyesinin en büyük etkisi kanserleşme olarak söylenebilir.

Yüksek MN frekanslarının da kansere neden olabileceği söylenebilir. Çünkü kanser hastalarının periferik lenfositlerinde MN oranının yüksek olduğu ve bu oranın kanserleşen hedef hücrelerdeki MN frekansı kadar olduğu saptanmıştır [29-31]. Uluslararası yapılan bir çalışmada MN frekansı ile kanser arasındaki ilişki açıkça gösterilmiştir [32].

Larvasidal etkili insektisit olarak yeni kullanıma sunulan PPX ile ilgili genotoksisite çalışmaları sınırlı sayıdadır. PPX'in genotoksik etkisi ile ilgili çalışmayı Alves ve ark. [42] yapmışlardır. Araştırmacılar PPX'in Allium cepa kök ucu hücrelerinde kromozomal hasarlara neden olduğunu bildirmişlerdir. PPX ayrıca tavuk (Gallus domesticus) embriyolarında beyin gelişimini engellemiş, DNA çift iplik kırıklarını ve apoptozisi indüklemiştir [43]. Başka bir çalışmada PPX'in zebra balığı (Danio rerio) embriyolarında düşük dozlarda genotoksik olmadığı fakat 1.66 µg/mL dozunda DNA hasarlarına neden olduğu ve apoptozisi indüklediği saptanmıştır [41]. Bu raporlar bizim bu çalışmadan elde edilen sonuçlarımızı desteklemektedir.

Kimyasallar iki farklı şekilde mitoz bölünmeyi inhibe ederek sitotoksik etki gösterebilirler. Ya hücrede enerji üreten mitokondri gibi organellerin fonksiyonlarını baskı altına alarak ATP üretimini azaltmaları yoluyla [65, 66] ya da yüksek oranda kromozomal hasarlar oluşturmaları yoluyla [67-69] sitotoksik etki gösterebilmektedirler. Çünkü bazı ksenobiyotiklerin DNA kırıklarına neden olmaları dolayısıyla sitotoksik etkili oldukları rapor edilmiştir [70, 71]. Yüksek CA oranı hücrelerin mitotik seleksiyona uğramasına ve mitoz döngüsünden atılmasına neden olabilmektedir [11, 72]. Bu çalışmada PPX klastogenik etkisi nedeniyle yüksek oranda kromozom ve kromatid kırıklarına neden olmuştur. Muhtemelen test maddesi sitotoksik etkisini bu yolla göstermiştir.

Zebra balıklarında PPX'nin on altı metaboliti tanımlanmıştır [73]. Metabolitlerle ilgili yapılan toksikolojik çalışmalarda hidroksilasyon metaboliti olan 4'-OH-pyriproxyfen'in pyriproxyfen'den ve ayrıca (-)-Pyriproxyfen'nin ise rac- ve (+)-pyriproxyfen'den 2 kat daha fazla toksik olduğu rapor edilmiştir. PPX ve hidroksillenmiş metabolitleri toksikolojik olarak antagonistik etkiler göstermektedir. PPX ve metabolitlerinin ayrıca CAT ve SOD aktivitesini inhibe ederek ve MDA'yı artırarak oksidatif stres hasarı göstermişlerdir [73]. Aynı sonuç rat hepatositleri için de rapor edilmiştir [45]. Bu veriler PPX'in in vivo ortamda daha büyük risk içerdiğini de göstermektedir.

PPX suda hızla fotodegradasyona uğrar. Organik maddenin yokluğunda, özellikle yüksek sıcaklık ve güneş ışığı ile aerobik su ortamındaki kalıcılığı da sınırlıdır [35]. Fakat PPX'in toprakta fotodegradasyon hızı yavaştır [74]. Toprağa yüksek afinite ile tutunmaktadır. Bitkilerde PPX translaminar (yaprığın bir yüzünden diğer yüzüne ulaşabilen ilaçlar) bir insektisid gibi davranarak etkisini gösterir. Bitkilerde yarı ömrü ise 1-3 hafta arasındadır. PPX'in biyodegradasyonu analiz edildiğinde, suda parçalanma hızının hızlı olması olumlu olarak karşılanırsa da toprakta uzun süre kalması bitkiler yoluyla besin zincirine sürekli katılımını sağlayacaktır. Özellikle bitkilerde 3 haftaya kadar varlığını devam ettirmesi olumsuz olarak düşünülmelidir. Çünkü, PPX juvenil hormon aktivitesini taklit ederek endokrin sistemi üzerindeki olumsuz etkileri düşünüldüğünde insan embriyolarında da aynı etkiyi yapabileceği unutulmamalıdır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Pyriproxyfen (PPX) tarımda böcek larvalarını öldürmek amacıyla kullanılan larvisidal etkili bir insektisittir. PPX gibi pestisidlerin tarımda yaygın kullanılması dolayısıyla besin zinciri yoluyla suya, toprağa, bitkilere ve tüm hayvanlara geçebileceği, özellikle çocukların bu kimyasallar için potansiyel bir hedef oldukları bir gerçektir. PPX juvenil bir hormon analogudur ve böcek büyüme düzenleyicisidir. Larvaların yetişkinliğe dönüşmesini engelleyerek böceklerin üremesini bloke etmektedir. Evrimsel süreçte tüm canlıların benzer metabolik işlevlere sahip oldukları göz önüne alındığında düzenleyici hormon olarak yetişkin ve çocuklarda risk oluşturabilmektedir.

Bununla birlikte pestisidlerin tarım zararlılarını yok etme amacıyla kullanılmaları yanında, bunların insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Çünkü genetik hasarlar başta kanser olmak üzere birçok sağlık sorununa neden olabilmektedirler.

Fakat genotoksisite çalışmalarında kullanılan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite ve sitotoksisite testlerinin hiç birisi tek başına yeterli değildir [75]. Bu çalışma, PPX'in *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik ve sitotoksik etkisiyle ilgili ilk çalışmadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre PPX genotoksik ve sitotoksik etkilidir. Fakat nihai sonuç için kimyasalın *in vivo* rat kemik iliği hücrelerinde genotoksik etkilerinin incelenmesi ile beraber bakteriyel reversiyon testlerinin de yapılması gerekmektedir. Bu testlerin sonuçlarına göre PPX'in genotoksisitesi hakkında karar verilmesi gerekir.

Fakat asla unutulmamalı ki, genotoksik etkili kimyasalların saptanması, kullanımlarının engellenmesi ve risk içermeyen alternatif kimyasalların geliştirilmesi hem bizim sağlığımız ve hem de gelecek nesillerin sağlığı için son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] S. Agar, H. Aydınolu, O. Temel, K. İkizunal, H. Ece, “Pestisid kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceğı”, *Türk Entemol. Dergisi*, 15(4):247-256, 1991.
- [2] W. A. Anwar, “Biomarkers of human exposure to pesticides”, *Environmental health perspectives*, 105(suppl 4), 801-806, 1997.
- [3] S. Pournourmohammadi, B. Farzami, S.N. Ostad, E. Azizi ve M. Abdollahi, “Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism”, *Environmental toxicology and Pharmacology*, vol. 19(1), pp. 191-196, 2005.
- [4] W.W. Hughes, “Essentials of Environmental Toxicology: The Effects of Environmentally Hazardous Substances on Human Health”, *Environment International*, vol. 3(23), pp. 422-425, 1997.
- [5] Z. Liang, X. Wang, B. Xie, Y. Zhu, J. Wu, S. Li, S. Meng, X. Zheng, A. Ji ve L. Xie, “Pesticide exposure and risk of bladder cancer: A meta-analysis”, *Oncotarget*, 7(41), 66959, 2016.
- [6] T. VoPham, K.A. Bertrand, J.E. Hart, F. Laden, M.M. Brooks, J.M. Yuan, E.O. Talbott, D. Ruddell, C.C.H. Chang ve J.L. Weissfeld, “Pesticide exposure and liver cancer: a review”. *Cancer Causes & Control*, vol.28(3), pp. 177-190, 2017.
- [7] M. del Pilar Navarrete-Meneses ve P. Pérez-Vera, “Pyrethroid pesticide exposure and hematological cancer: epidemiological, biological and molecular evidence”, *Reviews on environmental health*, 34(2), 197-210, 2019.
- [8] M. Topaktaş ve E. Rencüzoğulları, “Chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes treated with Marshal and its effective ingredient Carbosulfan”, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 319(2), 103-111, 1993.
- [9] M. Topaktaş, E. Rencüzoğulları ve H.B. İla, “In vivo chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats treated with Marshal”, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 371(3-4), 259-264, 1996.
- [10] E. Rencüzoğulları, B.A. Tüylü, M. Topaktaş, H.B. İla, A. Kayraldız, M. Arslan ve S.B. Diler, “Genotoxicity of aspartame”, *Drug and chemical toxicology*, 27(3), 257-268, 2004.

- [11] S. Bayram, A. Genc, M. Buyukleyla ve E. Rencuzogullari, "Genotoxicity and cytotoxicity of copper oxychloride in cultured human lymphocytes using cytogenetic and molecular tests", *Cytotechnology*, vol. 68(5), pp. 2027-2036, 2016.
- [12] M. Yilmaz, E. Rencuzogullari ve M. Canli, "The effects of cyfluthrin on some biomarkers in the liver and kidney of Wistar rats", *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22(6), pp. 4747-4752, 2015.
- [13] M. Yilmaz, E. Rencuzogullari ve M. Canli, "Investigations on the effects of etoxazole in the liver and kidney of Wistar rats", *Environmental Science and Pollution Research*, 24(24), 19635-19639, 2017.
- [14] A.V. Carrano ve A.T. Natarajan, "Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques", *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 204(3), pp. 379-406, 1988.
- [15] D. Anderson, "Genetic Toxicology Testing and Biomonitoring of Environmental or Occupational Exposure-Preface", *Mutation Research*, 204(3), 353-353, 1989.
- [16] L. Hagmar, A. Brøgger, I.L. Hansteen, S. Heim, B. Högstedt, L. Knudsen ve C. Reuterwall, "Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage", *Cancer research*, vol. 54(11), pp. 2919-2922, 1994.
- [17] J.A. Heddle, M.C. Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M.D. Shelby, J.D. Tucker ve J.T. MacGregor, "Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 18(4), pp. 277-291, 1991.
- [18] M. Fenech, "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology", *Toxicology*, vol. 181, pp. 411-416, 2002.
- [19] S. Bonassi, L. Hagmar, U. Strömberg, A.H. Montagud, H. Tinnerberg, A. Forni ve L.E. Knudsen, "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens", *Cancer Research*, vol. 60(6), pp. 1619-1625, 2000.

- [20] R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo ve M.D. Waters, "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 463(2), pp. 111-172, 2000.
- [21] S. Bonassi, A. Znaor, H. Norppa ve L. Hagmar, "Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective", *Cytogenetic and genome research*, vol. 104(1-4), pp. 376-382, 2004.
- [22] S. Bonassi, D. Ugolini, M. Kirsch-Volders, U. Strömberg, R. Vermeulen ve J.D. Tucker, "Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 45(2-3), pp. 258-270, 2005.
- [23] J.R. Savage, "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", *Environmental and molecular mutagenesis*, vol. 22(4), pp. 198-207, 1993.
- [24] J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus ve R. Marcos, "The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair", *Mutation Research/Genetic Toxicology*, vol. 342(1-2), pp. 43-59, 1995.
- [25] M. Topaktas ve E. Rencuzogullari, *Sitogenetik*, Ankara: Nobel Yayınları, 3.Baskı, 2021.
- [26] V.L. Dellarco, K.H. Mavournin ve R.R. Tice, "Aneuploidy and health risk assessment: current status and future direction", *Environmental Mutagenesis*, vol. 7(3), pp. 405-424, 1985.
- [27] M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari ve P. Van Hummelen, "The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 392(1-2), pp. 19-30, 1997.
- [28] H. Norppa ve G.C.M. Falck, "What do human micronuclei contain?", *Mutagenesis*, vol. 18(3), pp. 221-233, 2003.
- [29] T.J. Cheng, D.C. Christiani, X. Xu, J.C. Wain, J.K. Wiencke ve K.T. Kelsey, "Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung

- cancer”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 349(1), pp. 43-50, 1996.
- [30] F. Duffaud, T. Orsiere, P. Villani, A.L. Pelissier, F. Volot, R. Favre ve A. Botta, “Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients”, *Mutagenesis*, vol. 12(4), pp. 227-231, 1997.
- [31] S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W.P. Chang, N. Holland ve M.P. Bigatti, “An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans”, *Carcinogenesis*, vol. 28(3), pp. 625-631, 2007.
- [32] M. Fenech, N. Holland, W.P. Chang, E. Zeiger ve S. Bonassi, “The Human MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 428(1-2), pp. 271-283, 1999.
- [33] I. Ishaaya ve A.R. Horowitz, “Pyriproxyfen, a novel insect growth regulator for controlling whiteflies: mechanisms and resistance management”, *Pesticide Science*, 43(3), 227-232, 1995.
- [34] “Pyriproxyfen”, Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Pyriproxyfen#cite_note-3. [Erişim Tarihi: 10.12.2020]
- [35] J. Devillers, “Fate and ecotoxicological effects of pyriproxyfen in aquatic ecosystems”, *Environmental science and pollution research*, 27(14), 16052-16068, 2020.
- [36] M.D.F.P. Albuquerque, W.V. de Souza, A.D.C.G. Mendes, T.M. Lyra, R.A. Ximenes, T.V. Araújo ve L.C. Rodrigues, “Pyriproxyfen and the microcephaly epidemic in Brazil-an ecological approach to explore the hypothesis of their association”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 111(12), pp. 774-776, 2016.
- [37] S. Dzieciolowska, A.L. Larroque, E.A. Kranjec, P. Drapeau ve E. Samarut, “The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos”, *Scientific reports*, 7(1), 1-11, 2017.

- [38] R. Parens, H.F. Nijhout, A. Morales, F.X. Costa ve Y. Bar-Yam, “A possible link between pyriproxyfen and microcephaly”, *PLoS currents Outbreaks*, 9, 2017.
- [39] C.F. Marina, J.G. Bond, J. Muñoz, J. Valle, H. Quiroz-Martínez, J.A. Torres-Monzón ve T. Williams, “Efficacy of larvicides for the control of dengue, Zika, and chikungunya vectors in an urban cemetery in southern Mexico”, *Parasitology research*, vol. 117(6), pp. 1941-1952, 2018.
- [40] T.V.B. de Araújo, R.A. de Alencar Ximenes, D. de Barros Miranda-Filho, W.V. Souza, U.R. Montarroyos, A.P.L. de Melo ve E. Vazquez, “Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study”, *The Lancet infectious diseases*, vol. 18(3), pp. 328-336, 2018.
- [41] K. Maharajan, S. Muthulakshmi, B. Nataraj, M. Ramesh ve K. Kadirvelu, “Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (Danio rerio): a multi biomarker study”, *Aquatic Toxicology*, vol. 196, pp. 132-145, 2018.
- [42] P.E.S. Alves, M.D.D.A. Oliveira, P. Marcos de Almeida, F.A. Martins, A. Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, T. de Jesus Aguiar Dos Santos Andrade, C.M. Feitosa, M. Rai, A. Campinho Dos Reis, J. Soares da Costa Júnior, “Determination by chromatography and cytotoxic and oxidative effects of pyriproxyfen and pyridalyl”, *Chemosphere*, vol. 224, pp. 398-406, 2019.
- [43] M.R. Luckmann, M.S. de Melo, M.C. Spricigo, N.M. da Silva ve E.M. Nazari, “Pyriproxyfen exposure induces DNA damage, cell proliferation impairments and apoptosis in the brain vesicles layers of chicken embryos”, *Toxicology*, 464, 152998, 2021.
- [44] A. Shahid, S.D.E.S. Zaidi, H. Akbar ve S. Saeed, “An investigation on some toxic effects of pyriproxyfen in adult male mice”, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9), 997, 2019.
- [45] H. Liu, P. Li, P. Wang, D. Liu ve Z. Zhou, “Toxicity risk assessment of pyriproxyfen and metabolites in the rat liver: A vitro study”, *Journal of Hazardous Materials*, 389, 121835, 2020.

- [46] R.C. Lajmanovich, P.M. Peltzer, C. S. Martinuzzi, A.M. Attademo, A. Bassó ve C.L. Colussi, “Insecticide pyriproxyfen (Dragón) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles”, *Chemosphere*, 220, 714-722, 2019.
- [47] T.B. Piau, M. L. Fascineli, D.S. Moura, L.C. Albernaz, L.S. Espindola ve C. K. Grisolia, “In the screening of alternative insecticides to control *Aedes aegypti* larvae 2-methylantraquinone showed no genotoxicity and low toxicity to zebrafish (*Danio rerio*)”, *Genetics and Molecular Biology*, 45, 2020.
- [48] E.H.P. Aciole, N.N. Guimarães, A.S. Silva, E.M. Amorim, S.M. Nunomura, A.C.L. Garcia, S. Cunha ve C. Rohde, “Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, *Pest management science*, 70(4), 559-565, 2014.
- [49] J.M. Vani, L. de Carvalho Schweich, K.R.W. de Oliveira, S.A. Auharek, A.L. Cunha-Laura, A.C.M.B. Antoniolli-Silva, C.E.D. Nazario ve R.J. Oliveira, “Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice”, *Pesticide biochemistry and physiology*, 148, 22-27, 2018.
- [50] B.B. Pereira, E.S. Caixeta, P.C. Freitas, V.S.V. Santos, J.E. Limongi, E.O. de Campos Júnior, C.F. Campos, H.N. Souto, T.S. Rodrigues ve S. Morelli, “Toxicological assessment of spinosad: Implications for integrated control of *Aedes aegypti* using larvicides and larvivorous fish”, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(12), 477-481, 2016.
- [51] T. P. Mendonça, J. D. de Aquino, W. J. da Silva, D. R. Mendes, C. F. Campos, J. S. Vieira, N.P. Barbosa, M.P.C. Naves, E.O. de Campos Junior, A.A.A. de Rezende, M.A. Spano, A.M. Bonetti, V.S.V. Santos, B.B. Pereira ve C. R. de Moraes, “Genotoxic and mutagenic assessment of spinosad using bioassays with *Tradescantia pallida* and *Drosophila melanogaster*”, *Chemosphere*, 222, 503-510, 2019.
- [52] M. A. E. Noaishi, N. K. Abd Elfattah ve A. E. T. TA, “Comparative Toxicity Study of Novel Light-Activated Insecticide and Deltamethrin in Albino Rats”, *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 24(3), 424-433, 2021.

- [53] P.A.F. Waziry, A. Raja, C. Salmon, N. Aldana, S Damodar, A.R. Fukushima ve B.S. Mayi, “Impact of pyriproxyfen on virus behavior: implications for pesticide-induced virulence and mechanism of transmission”, *Virology Journal*, 17(1), 1-8, 2020.
- [54] “Priproxyfen”, National Pesticide Information Center, <http://npic.orst.edu/factsheets/pyriprogen.html>. [Erişim Tarihi: 10.12.2020].
- [55] H.J. Evans, *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. In: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols ve C. Ramel, (Eds.), Human peripheral blood 63 lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427, 1984.
- [56] P. Perry ve E.J. Thompson, *The methodology of sister chromatid exchanges*. In: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 459–529, 1984.
- [57] E. Rencuzogullari ve M. Aydin, “Methodology of genotoxic and teratogenic studies in rats. In: Félix L. (ed) Teratogenicity Testing”, *Methods in Molecular Biology*, New York, Humana Press, vol: 1797, 2018.
- [58] E. Rencüzoğulları ve M. Topaktaş, “The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B”, *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, vol. 5(3), pp. 19-24, 1991.
- [59] C. Paz-y-Miño, G. Bustamante, M.E. Sánchez ve P.E. Leone, “Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador”, *Environmental Health Perspectives*, 110(11), 1077-1080, 2002.
- [60] M. Fenech, “The *in vitro* micronucleus technique”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 455(1-2), pp. 81-95, 2000.
- [61] M. Kirsch-Volders, T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech ve H. Norppa, “Report from the *in vitro* micronucleus assay working

- group”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 540(2), pp. 153-163, 2003.
- [62] R. Turpin, J. Lejeune, *Human afflictions and chromosomal aberrations*. Pergamon Press, Oxford, 1969.
- [63] J. J. Yunis, *New chromosomal syndromes*. Academic Press, 1977.
- [64] L. E. Wilkins, J. A. Brown ve B. Wolf, “Psychomotor development in 65 home-reared children with cri-du-chat syndrome”, *The journal of pediatrics*, 97(3), 401-405, 1980.
- [65] D. Epel, “The effects of carbon monoxide inhibition on ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin egg”, *The Journal of cell biology*, 17(2), 315-319, 1963.
- [66] A. K. Jain ve R. K. Andsorphoy, “Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks”, *Cytologia*, 53(3), 427-436, 1988.
- [67] M. J. Armstrong, C. L. Bean ve S. M. Galloway, “A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 265(1), 45-60, 1992.
- [68] C. A. Hilliard, M. J. Armstrong, C. I. Bradt, R. B. Hill, S. K. Greenwood ve S. M. Galloway, “Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons”, *Environmental and molecular mutagenesis*, 31(4), 316-326, 1998.
- [69] S. M. Galloway, J. E. Miller, M. J. Armstrong, C. L. Bean, T. R. Skopek ve W. W. Nichols, “DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA-reactive and non-DNA-reactive clastogens”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400(1-2), 169-186, 1998.
- [70] E.H. Vock, W.K. Lutz, P. Hormes, H.D. Hoffmann ve S. Vamvakasa, “Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and γ -irradiation”, *Mutation*

- Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 413(1), 83-94, 1998.
- [71] D. J. Kirkland, L. Muller, “Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds”, *Mutat Res*, 464:137–147, 2000.
- [72] A. Y. Kocaman, E. Rencuzogullari, M. Topaktas, “*In vitro* investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes”, *Environ Toxicol*, 29(6), 631–641, 2014.
- [73] Y. Wei, J. Cui, W. Zhai, X. Liu, Z. Zhou, P. Wang ve D. Liu, “Toxicity and fate of chiral insecticide pyriproxyfen and its metabolites in zebrafish (*Danio rerio*)”, *Environmental Pollution*, 280, 116894, 2021.
- [74] J. Devillers, “Fate of pyriproxyfen in soils and plants”, *Toxics*, 8(1), 20, 2020.
- [75] E. Rencüzoğulları ve M. Aydın, “Genotoxic and mutagenic studies of teratogens in developing rat and mouse”, *Drug and Chemical Toxicology*, 42(4), 409-429, 2019.