



T.C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DELTAMETRİN VE THİAKLOPRİD KARIŞIMININ İNSAN
AKCİĞER HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ VE DNA
ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

BARBAROS ERTÜRK

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2019

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**DELTAMETRİN VE THİAKLOPRİD KARIŞIMININ İNSAN
AKCİĞER HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ VE DNA
ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

BARBAROS ERTÜRK

DOKTORA TEZİ

ORDU 2019

TEZ ONAY

Barbaros ERTÜRK tarafından hazırlanan "DELTAMETRİN VE THIAKLOPRİD KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ VE DNA ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.06.2019 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oy birliği ile Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU

Jüri Üyeleri

Danışman
Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu
Üniversitesi
Üye
Prof. Dr. Haluk KEFELİOĞLU
Biyoloji Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye
Prof. Dr. Tevfik NOYAN
Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Ordu Üniversitesi
Üye
Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ
Biyoloji Bölümü, Amasya Üniversitesi
Üye
Dr. Öğr. Üyesi Muhammet AY
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Alanya
Alaaddin Keykubat Üniversitesi

İmza

.....
.....
.....
.....
.....

20/08/2019 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 22/08/2019 tarih ve ..2019/495 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



.....
Enstitü Müdürü
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



BARBAROS ERTÜRK

Bu tez, 115Z817 numaralı TÜBİTAK-3001 projesi ile desteklenmiştir.

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

ÖZET

DELTAMETRİN VE THIAKLOPRİD KARIŞIMININ İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTESİ VE DNA ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

BARBAROS ERTÜRK

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ, 110 SAYFA

TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

Çeşitli insektisitlerin, akciğer kanserinin gelişiminde potansiyel moleküler biyogöstergelerden olan düzensiz promotör gen metilasyonu gibi moleküler değişimlere yol açabildiği ileri sürülmektedir. Deltametrin ve thiakloprid karışım halinde tarımda yaygın olarak kullanılan insektisitlerdir. Ancak bu insektisitlerin karışım halde kullanıldığında, insan akciğer hücrelerindeki sitotoksik ve DNA hasarı ve tamiri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu insektisitlerin insan akciğer hücrelerindeki (BEAS-2B) sitotoksitesi, DNA çift zincir kırıkları ve tamiri üzerindeki etkileri ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Deltametrin ve thiakloprid karışımının Sitotoksitesi; MTT ve klonojenik testleri ile, DNA çift zincir kırıkları ve tamiri üzerindeki etkileri ise tümör baskılayıcı protein olan p53 bağlayıcı protein-1 (53BP1) ve H2AX tipi histonun fosforilasyonu ile oluşan γ -H2AX proteinlerinin oluşturdukları odakların immüno Floresan yöntemi ile belirlenmiştir.

Sitotoksite deneylerinde akciğer epitel hücreleri 0.001 + 0.016 mM ve 0.166 + 2.5 mM (deltametrin + thiakloprid) arasında toplam 10 farklı konsantrasyonda insektisit karışımı ile 24 ve 120 saatliğine muamele edilmiştir. Klonojenik test sonuçları, doz artışına bağlı olarak hem 24 hem de 120 saatlik maruziyetlerin hücre canlılığını azalttığını ve deltametrin ile thiakloprid karışımının özellikle yüksek dozlarda sitotoksik olduğunu göstermiştir. Klonojenik test ile uyumlu olarak MTT testinin sonuçları da bu insektisitlerin karışımlarının özellikle yüksek dozlarda oldukça sitotoksik olduğunu ortaya koymuştur.

DNA çift zincir kırık hasarı oluşturma potansiyelini belirlemek için hücreler 0.011 + 0.160, 0.022 + 0.333 ve 0.044 + 0.666 mM konsantrasyonlarda deltametrin ve thiakloprid karışımı ile muamele edilmiş ve γ -H2AX ile 53BP1 proteinlerinin oluşturduğu odaklar tespit edilmiştir. 24 saat sonunda orta ve yüksek konsantrasyonlarda, γ -H2AX odak oluşumunda kontrole göre istatistiksel olarak önemli artışlar tespit edilmiştir. 53BP1 ve kolokalizasyon odakları ise sadece en yüksek konsantrasyonda kontrolden önemli derecede farklı bulunmuştur. 120 saatlik muamelede ise, hem γ -H2AX hem 53BP1, hem de kolokalizasyon odaklarının çözücü kontrole karşılaştırıldığında orta ve yüksek konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.

24 saatlik muamele sonrası etken maddelerin uzaklaştırılması ve hasarın onarımı için ekstra 24 saatlik iyileşme süresi tanınan hücrelerde tüm odaklar istatistiksel anlamda önemli olacak şekilde düşüş göstermiştir. Ancak, 120 saatlik muamele sonrası tanınan 24 saatlik iyileşme süresi en yüksek konsantrasyon için etkili olmamıştır. Çünkü en yüksek konsantrasyonda tüm odaklar, çözücü kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: 53BP1, Deltametrin, İnsan Akciğer Hücreleri, Sitotoksite, Thiakloprid, γ -H2AX.

ABSTRACT

EFFECTS OF MIXTURE OF DELTAMETHRIN AND THIACTOPRID ON DNA DOUBLE STRAND BREAKS AND CYTOTOXICITY ON HUMAN LUNG CELLS

BARBAROS ERTURK

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED
SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

PhD THESIS, 110 PAGES

SUPERVISOR: Assoc. Prof. Dr. VEDAT ŞEKEROĞLU

It has been stated that some insecticides can cause irregular gene promoter methylation which is the potential molecular biomarkers in the development of lung cancer. Deltamethrin and thiacloprid are widely used insecticides as mixture in agriculture. However, there is no report about effects of these insecticides on cytotoxicity and DNA damage and repair in human lung cells. Effects of these insecticides on cytotoxicity, DNA double-chain breaks and repair in human lung epithelial cells (BEAS-2B) were demonstrated for the first time in this study. The cytotoxicity of the mixture of deltamethrin and thiacloprid was determined by MTT and clonogenic assays, while their effects on DNA double strand breaks and repair were determined by immunofluorescence method by counting the foci of tumor suppressor protein p53-binding protein-1 (53BP1) and γ -H2AX proteins formed by phosphorylation of H2AX histone.

The lung epithelial cells were treated with mixtures of insecticides at 10 different concentrations between 0.001 + 0.016 mM and 0.166 + 2.5 mM (deltamethrin + thiacloprid) for 24 and 120 hours in cytotoxicity experiments. Clonogenic assay results have shown that both 24- and 120-hour treatments decreased the cell viability in a concentration-dependent manner and mixture of deltamethrin and thiacloprid was cytotoxic, especially at the higher concentrations. Consistent with the clonogenic test, the results of the MTT assay also showed that the mixture of these insecticides were highly cytotoxic at higher concentrations.

The cells were treated with mixture of deltamethrin and thiacloprid at concentrations of 0.011 + 0.160, 0.022 + 0.333 and 0.044 + 0.666 mM to determine the DNA double-chain breaks, and foci formed by γ -H2AX and 53BP1 proteins were detected. Statistically significant increases were observed in γ -H2AX foci formation at medium and high concentrations compared to control after 24 hours' treatment. 53BP1 and colocalization foci were only significant at the highest concentration. All foci of γ -H2AX and 53BP1 and colocalization increased statistically significantly at medium and high concentrations in 120 hours' treatment compared to control.

After 24 hours of treatment, all foci decreased statistically significant in cells that were given an extra 24-hour recovery period for removal of the insecticides and repair of the damage. However, the 24-hour recovery period after 120 hours of treatment was not effective for the highest concentration. Because all foci at the highest concentration were statistically significantly higher compared to control.

Keywords: 53BP1, Deltamethrin, Cytotoxicity, Human Lung Cells, Thiacloprid, γ -H2AX.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazımı esnasında danışman hocam Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na, deneysel çalışmalarım sırasında her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen Prof. Dr. Zülal ATLI ŞEKEROĞLU'na, Uzman Biyolog Seval KONTAŞ YEDİER'e ve Uzman Biyolog Araş. Gör. Biyolog Serdar YEDİER'e ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün tüm akademik ve idari personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm dönemde jürimde yer alan Prof. Dr. Haluk KEFELİOĞLU, Prof. Dr. Tevfik NOYAN, Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ, Doç. Dr. Ömer ERTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Muhammet AY'a vermiş oldukları destek ve önerilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktoraya başlamama vesile olan ve bu süreci yürütmemde bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Nigar ERTÜRK'e ve Ersan GEDİZ'e, eşim Dr. Öğr. Üyesi Aliye GEDİZ ERTÜRK'e, kızım Nehir ERTÜRK'e, ablam Işın BALIBEY'e ve çalışmalarımın her aşamasında bana büyük destekte bulunan ablam Prof. Dr. Neval ERTÜRK'e minnet borcumu asla ödeyemem.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Böceklerle Mücadelede Yaygın Kullanılan İnektisitler	6
2.1.1 Piretroit Grubu İnektisitler	6
2.1.2 Piretroitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri	7
2.1.3 Neonikotinoitlerin Genel Özellikleri.....	7
2.1.4 Neonikotinoitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri	8
2.2 Deltametrin.....	8
2.2.1 Deltametrinin Emilimi ve Metabolizması.....	9
2.2.2 Deltametrinin Akut Toksik Etkileri	10
2.2.3 Deltametrinin İnsanlara Olan Toksik Etkileri	11
2.2.4 Deltametrinin Genotoksik Etkileri	11
2.3 Thiakloprid.....	12
2.3.1 Thiaklopridin Emilimi ve Metabolizması.....	13
2.4 DNA Hasarları	14
2.5 Pestisitlerin Genotoksik Etkileri	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1 Kullanılan Aletler.....	22
3.1.1 Biyogüvenlik Kabini	22
3.1.2 Karbondioksit (CO ₂)'li İnkübatör	22
3.1.3 Hassas Terazı	22
3.1.4 Santrifüj.....	22
3.1.5 Hücre Sayım Cihazı	22
3.1.6 Mikroskoplar	23
3.1.6.1 İvert Mikroskop.....	23
3.1.6.2 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu	23
3.1.7 Mikroplaka Eliza Okuyucu	23
3.1.8 Vorteks Karıştırıcı.....	23
3.1.9 Su Banyosu	24
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
3.2.1 İnektisitler.....	24
3.2.1.1 Deltametrin (SIGMA)	24
3.2.1.2 Thiakloprid (SIGMA)	25
3.2.1.3 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK).....	26
3.2.1.4 Kültür Ortamı	26
3.2.1.5 Attachment (Bağlantı) Faktör (AF) (GIBCO)	26
3.2.1.6 Ultra Saline (LONZA)	26
3.2.1.7 Tripsin-EDTA (LONZA).....	27

3.2.1.8 Tripsin Nötralizasyon Solüsyonu (TNS) (LONZA)	27
3.2.1.9 Kosmik Kalf Serum (LONZA)	27
3.2.1.10 Sıvı Azot (LN)	27
3.2.1.11 Metanol (SIGMA).....	27
3.2.1.12 Kristal Viyole (SIGMA)	27
3.2.1.13 Trypan Mavis (GIBCO).....	28
3.2.1.14 Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO)	28
3.2.1.15 Paraformaldehit Solüsyonu (CHEMCRUZ)	28
3.2.1.16 Octylphenol Ethoxylate (Triton X-100) (SIGMA)	28
3.2.1.17 Sodyum Azide (SIGMA)	28
3.2.1.18 Horse Serum (GIBCO).....	28
3.2.1.19 Bovine Serum Albümin (CHEMCRUZ).....	28
3.2.1.20 Anti-gamma H2A.X Phospho-Histone (ABCAM).....	28
3.2.1.21 Anti-53BP1 Antibody (CELL SIGNALING).....	28
3.2.1.22 Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG (ABCAM)	29
3.2.1.23 Alexa Fluor 555 Goat Anti-mouse (ABCAM)	29
3.2.1.24 Prolong Gold Antifade Reagent - DAPI	29
3.3 Yöntemler.....	29
3.3.1 Hücre Kültürü.....	29
3.3.2 Hücre Hattının Çözülmesi.....	30
3.3.3 Hücre Hattının Pasajlanması	30
3.3.4 Hücre Hattının Dondurulması	30
3.3.5 Hücre Sayımı.....	31
3.3.6 Klonojenik Test.....	31
3.3.7 Deney Planı ve Grupları.....	32
3.3.7.1 Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu	33
3.3.7.2 Pozitif Kontrol Grubu	33
3.3.7.3 İnsektisit Karışım Grupları.....	33
3.3.7.4 İyileşme (Recovery) Grupları	33
3.3.8 MTT Testi	34
3.3.9 Ko-Lokalizasyon Testi	34
3.3.10 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	38
4.1 Klonojenik Test Sonuçları (IC ₅₀ 'nin ve Deney Dozlarının Belirlenmesi).....	39
4.2 MTT Testi Sonuçları.....	44
4.3 Klonojenik Test Sonucu Belirlenen Deney Dozları ile Yapılan MTT Test Sonuçları	48
4.4 Ko-Lokalizasyon Testi Sonuçları (DNA Hasar ve Tamirinin Belirlenmesi).....	51
4.5 Sitotoksosite	61
4.6 Hormesis	64
4.7 DNA Hasarı.....	66
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
6. KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 DNA Hasarı Sonucunda Aktive Olan Biyokimyasal Ağlar	18
Şekil 2.2 DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Sonuçları.....	19
Şekil 3.1 Deltametrin (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü ...	25
Şekil 3.2 Thiakloprid (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Cubuk Formülü....	25
Şekil 3.3 24 ve 120 Saatlik Antikor Konsantrasyonlarının Optimizasyon Denemeleri	36
Şekil 3.4 Deltametrin Thiakloprid Karışımının 120 Saatlik Uygulaması ile Elde Edilmiş BEAS-2B Hücreleri	36
Şekil 4.1 İnsektisit Karışımı ile 120 Saat Muamele Edilen BEAS-2B Hücreleri ile Yapılan Klonojenik Test	40
Şekil 4.2 24 Saatlik Uygulama Sonrası İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Hücre Sağkalımının Değişimi.....	42
Şekil 4.3 120 Saatlik Uygulama Sonrası İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Hücre Sağkalımının Değişimi.....	42
Şekil 4.4 96 Kuyucuklu Kültür Kaplarında Yapılan Uygulama Planı.....	44
Şekil 4.5 24 ve 120 Saat Uygulamalarında Kontrole Göre Hücre Canlılığının (%) İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi	47
Şekil 4.6 24 ve 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksosite Değerleri	48
Şekil 4.7 Kontrole Göre Hücre Canlılığının İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi (24 Saat).....	49
Şekil 4.8 Kontrole Göre Hücre Canlılığının İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi (120 Saat).....	50
Şekil 4.9 24 ve 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Ortalama Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksosite Değerleri.....	50
Şekil 4.10 24 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilmiş BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Doza Bağlı ve Kontrole Göre Değişim Örnekleri	52
Şekil 4.11 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilmiş BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Doza Bağlı ve Kontrole Göre Değişim Örnekleri	53
Şekil 4.12 24 Saatlik Uygulaması Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri.....	55
Şekil 4.13 120 Saatlik Uygulama Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri.....	56
Şekil 4.14 24 Saatlik Uygulaması ve 24 Saat İyileşme Süresi Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri	58
Şekil 4.15 120 Saatlik Uygulaması ve 24 Saat İyileşme Süresi Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri	59

- Şekil 4.16** Deltametrin ve Thiaklopid Karışımının Uygulamasının Oluşturduğu γ H2AX, 53BP1 ve Birlikte Lokalize Odakların 24 ve 120 Saat Dozlarına Bağlı Değişimlerin Yığılmış Sütun Grafiği ile Birlikte Gösterimi 59
- Şekil 4.17** Deltametrin ve Thiaklopid Karışımının Uygulamasının 24 Saat + İyileştirme ve 120 Saat + İyileştirme Sürelerine ait Dozlara Bağlı γ H2AX, 53BP1 ve Birlikte Lokalize Odakların Değişimlerinin Yığılmış Sütun Grafiği ile Birlikte Gösterimi..... 60

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Klonjenik Testte Uygulanan Deltametrin / Thiaklopid Uygulama Dozları	32
Çizelge 3.2 Deltametrin / Thiaklopid IC ₅₀ 'ye Göre Belirlenen Dozlar	33
Çizelge 3.3 Ko-Lokalizasyon Antikor Dozlarının Belirlenmesi.....	35
Çizelge 4.1 24 ve 120 Saatlik Klonojenik Test Sonuçları	41
Çizelge 4.2 24 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	45
Çizelge 4.3 120 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri	45
Çizelge 4.4 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 ve 120 Saat Uygulamaya ait Hücre Canlılığı Değerleri.....	46
Çizelge 4.5 24 Saat Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri.....	48
Çizelge 4.6 120 Saat Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri.....	49
Çizelge 4.7 24 ve 120 Saatlik Uygulamalardaki Hücre Canlılığı Değerleri.....	49
Çizelge 4.8 24 ve 120 Saatlik Uygulaması Sonrası Doza Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları	54
Çizelge 4.9 24 ve 120 Saatlik Uygulaması Sonrası 24 Saat İyileşme Periyodu Uygulanan Gruplarda Doza Bağlı Olarak Hücre Başına Düşen Ortalama Odak Sayıları.....	57

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Attachment Faktör: (Bağlantı Faktörü)
ASD	: Autism Spectrum Disorders: (Otizm Spektrum Hastalıkları)
ATM	: Ataksia-Telangiectasia Mutated: (DNA Tamir Proteinleri)
BEAS-2B	: İnsan Bronşiyal Epitel Hücre Hattı
BER	: Base Excision Repair: (Baz Ekisyon Tamiri)
DEL	: Deltametrin
DHT	: DNA Hasar Tepkisi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSB	: DNA Double-Strand Break: (DNA Çift Zincir Kırığı)
DSBR	: DNA Double-Strand Break Repair: (DNA Çift Zincir Kırığı Tamiri)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
HR	: Homolog Rekombinasyon
IC₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon
KH	: Kromozom Hasarı
KKD	: Kardeş Kromatit Değişimleri
LD₅₀	: Test Edilen Ortamda Bulunan Popülasyonun Yarısının Ölümüne Yol Açması İçin Gerekli Doz Miktar.
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MI	: Mitotik İndeksi (Bir Hücre Populasyonunda Mitoz Bölünme Yapan Hücrelerin Tüm Hücrelere Oranı)
MMR	: Mismatch Repair: (Yanlış Eşleşme Tamiri)
MN	: Mikronükleus
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Yl)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
NER	: Nucleotide Excision Repair: (Nükleotid Ekzisyon Tamiri)
NHEJ	: Non-Homologous end-Joining: (Non-Homolog Uç Eşleştirme)
OD	: Optik Density: (Optik Yoğunluk)
PBS	: Phosphate Buffered Saline: (Fosfat Tamponlu Salin)
PI	: Proliferasyon Oranı: (Hücrelerin Çoğalma Oranı)
ROS	: Reactive Oxygen Species: (Reaktif Oksijen Türleri)
SE	: Standart Hata
THI	: Thiaklopid
TNS	: Tripsin Nötralize Solüsyonu
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ

Yeşil Devrim (Green Revolution) ya da Üçüncü Tarım Devrimi (Third Agricultural Revolution) 1950'lerde başlayan ve 1960 sonlarında amacına ulaşan, tarımda üretimin ve ürün kalitesinin artırılmasını amaçlayan araştırma ve teknoloji gelişimi hareketidir. Yeşil Devrim birkaç önemli teknolojik gelişmeyi kullanarak tarımda verimi artırma amacını güdüyordu. Bu teknolojik gelişmeler;

- Hibridizasyon teknikleri kullanılarak yüksek verimli ve hastalığa dayanıklı tarım ürünlerinin geliştirilmesi (Ghisari ve ark., 2015).
- Kontrollü su kullanımı (Aktar ve ark., 2009).
- Tarımda makinalaşma (Evenson ve ark., 2003).
- Suni gübre kullanılarak ürün veriminin artırılması (Tilman, 1998).
- Pestisit kullanılarak ürün kaybının minimuma indirilmesi (Pingali, 2012).

Dr. Norman Borlaug yukarıdaki beş stratejiyi Meksika, Pakistan ve Hindistan'da kullanarak on yıl içerisinde Meksika'yı kıtlıkla savaştan bir ülke olmaktan buğday ihraç eden bir ülke haline getirirken, Pakistan ve Hindistan'da da kıtlık tehlikesini minimuma indirmiştir. Bu başarıları nedeniyle Yeşil Devrimin Babası olarak adlandırılmıştır ve 1970 yılında Nobel Barış Ödülüne, Amerika Birleşik Devletleri'nde Altın Hürriyet Madalyasına (Presidential Metal of Freedom) ve Liyakat Madalyasına (Congressional Gold Medal) layık görülmüştür (Tilman, 1998; Evenson ve ark., 2003; Pingali, 2012).

Yeşil Devrim'in çok önemli ve olumlu sonuçları vardır. Bunlar buğday, pirinç ve mısır üretiminde görülen büyük artışlar, bir yılda birkaç ürün alma olanağı, makinalaşma sayesinde çiftçilerin yaşam standardının ve gelirlerinin yükselmesi, sulamalı tarım alanlarının genişletilmesi, gübre ve pestisit gibi kimyasalların kullanımı arttığı için yeni bir endüstri kolunun ortaya çıkmış olması şeklinde özetlenebilir. Ancak Yeşil Devrim, gıda yetersizliğini engellemede çok önemli bir rol oynamış ve çok olumlu sonuçlar vermiş olsa da olumsuz bazı etkileri de beraberinde getirmiştir. Bu etkiler özellikle çok miktarda kullanılan pestisitlerden ileri gelmektedir (Tilman, 1998; Evenson ve ark., 2003; Pingali, 2012).

Pestisitler haşerelere karşı kullanılan çok geniş kapsamlı heterojen kimyasal maddelerdir. Böceklere karşı kullanılan insektisitler, mantar ve küflere karşı kullanılan

fungisitler, yabancı otlara karşı kullanılan herbisitler, kemirgenlere karşı kullanılan rodentisitler, yumuşakçalara karşı kullanılan mollussisitler, nematodlara karşı kullanılan nematisitler, bitki büyüme düzenleyicisi kimyasallar ve diğer pek çok kimyasallar pestisit grubu içerisinde. İnsektisitler, böcekleri öldürmekte kullanılan maddelere verilen genel addır (IUPAC, 2018). Bu maddeler yumurtaları öldüren ovisit, larvaları öldüren larvisitleri de kapsar. İnsektisitler tarım, tıp ve endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Hemen hemen tüm insektisitler ekosistemde önemli bir etki yapabilir, insanlara ve diğer hayvanlara karşı toksik etkileri olabilir ve besin zinciri içerisinde belirli türlerde yüksek oranda birikme kapasitesine sahiptirler (Emden ve Peakall, 1996).

İnsektisitler farklı kriterler kullanılarak sınıflandırılmaktadır. Örneğin rezidüel (kalan) etkileri göz önüne alındığında iki ana gruba ayrılmaktadır;

- I.** Rezidüel ve uzun süreli etkisi olan sistemik insektisitler
- II.** Rezidüel aktivitesi olmayan kontak insektisitlerdir.

Kimyasal orijinleri göz önüne alındığında insektisitler üç gruba ayrılır;

- I.** Doğal insektisitler, örneğin nikotin, piretrum ve neem yağı ekstraları,
- II.** İnorganik insektisitler, bunlar metal içeriklidir,
- III.** Organik insektisitler, bunlar organik kimyasal birleşiklerdir.

Bu insektisitlerin çoğunluğu kontak yoluyla etkisini gösterir. İnsektisitlerin etki şekli, bir insektisit in haşereyi nasıl öldürdüğünü ya da etkisiz hale getirdiğini açıklayan mekanizmadır. Pek çok bilim insanı insektisitleri etki şekline göre sınıflandırmaktadır. Bu mekanizmalar ayrıca bir insektisit in hangi hayvanları fizyolojik olarak etkileyeceğini de bize gösterir. İdeal bir pestisit hedef organizmaya (target organizma) ölümcül olmalı, ancak hedef olmayan organizmalara (non-target organizmalar) özellikle insana zarar vermemelidir. Ne yazık ki gerçekte pestisitler hedef olmayan organizmalara da zarar vermektedir (Aktar ve ark., 2009).

Tarım alanlarındaki yoğun kullanımı, pestisitlerin ve türevlerinin doğada birikimine ve doğal kaynakları kontamine etmesine sebep olmaktadır. Bu birikim ve kontaminasyonda insan ve diğer hayvanların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu olumsuz etkiler anında gözlenen pestisit zehirlenmesinden daha uzun sürede

gözlenen endokrin bozukluklarını ve hatta DNA hasarlarını içermektedir (Ghisari ve ark., 2015).

Hücrelerin en önemli yapı taşı olan DNA sürekli olarak hasar görmektedir. Bu kaçınılması mümkün olmayan bir durumdur. Çünkü DNA'da hasara sebep olan maddelerin büyük çoğunluğu, hücrenin normal metabolizması sonucu ortaya çıkar. Hücre metabolizmasının yan ürünü olan kimyasallar, örneğin reaktif oksijen türleri (ROS), DNA'da replikasyonu bile durduracak kadar hasara sebep olurlar. Bu tip hasarlar genelde DNA'da çift zincir kırığına sebep olur. Bu da kromozomlarda hasar yaratır. DNA'da görülen çift zincir kırıkları yalnız ROS nedeniyle oluşmaz, ama aynı zamanda ultraviyole (UV) ışık ve kimyasal maddeler gibi çevresel etkilerden dolayı da oluşabilir. Evrimsel süreç içerisinde hücrede oluşan bu tip hasarları tamir edecek bazı mekanizmalar gelişmiştir. Hücre bu tip hasarlara uğradığında; Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (Base Excision Repair: BER), Nükleotid Kesip-Çıkarma Onarımı (Nucleotide Excision Repair: NER) ve DNA çift zincir kırığı tamiri (DNA Double-Strand Break Repair: DSBR) mekanizmaları harekete geçirilir (Aguilera ve Gomez-Gonzalez, 2008).

DNA hasarları içerisinde en tehlikeli olan çift zincir kırıklarıdır. Çünkü bunlar tamir edilmeyecek olursa delesyon (bir kromozomun bir parçasının kopup, kaybolmasıyla meydana gelen kromozom anomalisi), translokasyon (bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalisi) gibi kromozom mutasyonlarına sebep olabilirler. Bu tip kromozom hasarları genelde kanser hücrelerinde görülmektedir (Aplan, 2006). Hücrelerde DNA hasarına sebep olan en önemli mekanizma ROS oluşumudur. Pek çok pestisit'in etki mekanizması ROS üreterek oksidatif strese neden olmalarıdır (Banerjee ve ark., 1996; Banerjee ve ark., 1998; Banerjee ve ark., 1999; Abdollahi ve ark., 2004; Banerjee ve ark., 2011). ROS'lerin hücre zarı lipitlerine, proteinlere ve DNA'ya verdikleri hasarlar böceklerin ölümüne sebep olmaktadır. ROS'lerin DNA'nın yapısına verdiği hasarlar aynı zamanda kromozom anormalliklerinin, DNA'da meydana gelen kırıklıkların ve diğer mutasyonların ana sebebidir.

Zirai mücadelede etkinliği artırmak için önerilen pestisit karışımlarından en etkili olarak tavsiye edilenlerinden biri; deltametrin ve thiakloprid karışımıdır.

Deltametrinin ve thiaklopridin toksik etkilerini ayrı ayrı araştıran yayınlar vardır, ancak bu karışımların toksik etkilerini araştıran yayın sadece bir tanedir. Bu yayında deltametrin ve thiakloprid, sıçanlara (*Rattus norvegicus*) tek başlarına ve karışım olarak 24 saat ve 30 gün boyunca uygulanmıştır. Uygulama sonucu sıçan kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksinde (MI) ve binükleat hücre sayısında istatistiksel olarak önemli olan azalma ve kromozom anormalliklerinde ve mikronükleus sayısında ise önemli derecede artış bildirilmiştir (Şekeroğlu ve ark., 2013). Bu konuda yaygın bir araştırma yapılmadığı için bu çalışmanın amacı, deltametrin ve thiaklopridin genotoksik etkilerinin insan hücre kültürlerinde moleküler seviyede *in-vitro* araştırılmasıdır.

Çalışmamızın amacı, ülkemizde karışım halinde yaygın olarak kullanılan deltametrin ve thiakloprid birlikteliğinin insan akciğer epitel (BEAS-2B) hücrelerinde gösterdiği sitotoksik etkilerin MTT viyabilite testi ile ölçülmesi ve genotoksik etkilerinin klonojenik test ile belirlenmesidir. Ayrıca bu insektisit karışımının DNA çift kırıklarına sebep olup olmadığı, DNA çift kırık bölgelerine yerleşerek onarımda yer alan γ -H2AX ve 53BP1 proteinlerinin düzeylerinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İlişkiler Bölümü (DESA-World Population Prospects) raporuna göre, dünya nüfusu 2030 yılında 8.6 milyara, 2050 yılında 9.8 milyara ve 2100 yılında ise 11.2 milyara ulaşacak. Bugün yaklaşık 7.6 milyar olan dünya nüfusunu beslemek büyük bir sorun oluşturmaktadır. Hızlı nüfus artışı bu sorunun önemini her geçen gün daha da arttırmaktadır. Bu nedenle tarım ürünlerinin verimliliğini arttırmak, insanlığın geleceği açısından hayati bir öneme sahiptir. Tarım ürünlerinin verimini ve gıda kalitesini sınırlayan hastalık, haşere, zararlı ve yabancı otlardan bitkileri korumak ve tarım ürünlerinin verimini ve kalitesini yükseltmek amacıyla yapılan tüm işlemlere Bitki Koruma ya da Zirai Mücadele adı verilir ve Zirai Mücadelenin, 21. yüzyılın açlığa karşı en önemli savaş yöntemi olacağı bildirilir (Godfray ve ark., 2010).

Günümüzde Zirai Mücadelenin en önemli araçlarından biri hala haşerelere karşı kullanılan pestisitler (Swanton ve ark., 2011) ve hastalığa dayanıklı ürün yetiştirilmesidir (Carolan ve ark., 2017). Ancak pestisitlerin aşırı kullanımı beraberinde çeşitli sorunlar getirmektedir. Bunlardan en önemlisi haşerelerin pestisitlere karşı dayanıklı hale gelmesidir. Bilim insanları her gün insektisitlere dayanıklı böcekler (Bass ve ark., 2015), herbisitlere dayanıklı yabancı otlar (Powles ve Yu, 2010) ve fungusitlere dayanıklı küfler (Lucas ve ark., 2015) rapor etmektedirler. Bu direnç problemi, zirai mücadele uzmanlarının en büyük sorunlarından biridir. Dirençli böceklerle başa çıkmak ve direnç oluşumunu yavaşlatmak için zirai mücadele uzmanları, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency) dahil olmak üzere pestisit karışımları kullanmayı önermektedir (EPA, 2016).

Zirai mücadele uzmanları; pestisit karışımlarının, etki mekanizması farklı olan pestisitlerin karıştırılarak hazırlanmasını önermektedir. Ancak bu karışımlar, haşerelerin direnç kazanmasını geciktiriyor olsa da çevreye ve hedef olmayan organizmaların sağlığına karşı bir tehlike oluşturmaktadırlar.

Yakın zamanlarda piretroit grubu bir insektisit olan deltametrin ve neonikotinoit grubu bir insektisit olan thiakloprid karıştırılarak yeni bir pestisit formülü piyasaya sürülmüştür. Başta deltametrin olmak üzere bu iki pestisitinin ayrı ayrı etki

mekanizmalarını ve toksik etkilerini içeren *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Ancak birlikte kullanımları halinde etkilerinin araştırıldığı *in vitro* sitotoksik ve genotoksik çalışma yetersizdir.

2.1 Böceklerle Mücadelede Yaygın Kullanılan İsektisitler

Organoklorinler, piretroitler, karbamatlar ve organofosfatlar grubu isektisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı böcek türleri organofosfatlı ve organoklorlu isektisitlere karşı direnç geliştirmelerinden dolayı, bu isektisit türevlerinin kullanımı azalmıştır. Bu nedenle alternatif ürün olarak piretroitlerin ve neonikotinoitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Kovganko ve Kashkan, 2004; Çakır ve Yamanel, 2005.)

Çalışmamızda kullanılan deltametrin piretroit, thiaklopid ise neonikotinoit grubu isektisitlerdir.

2.1.1 Piretroit Grubu İsektisitler

Doğal piretrinlerin kimyasal yapıları hızlıca bozulduğu ve üretim maliyetleri yüksek olduğu için, doğal ürünlerin yapısına azot, kükürt ve halojen grupları eklenmiştir. Bu şekilde etkinlikleri ve kararlılıkları artırılarak piretroitler adı verilen sentetik piretrinler elde edilmiştir (Elliott, 1980). Ayrıca kimyasal olarak alfa-siyano grubu taşıyıp taşıyamamalarına göre Tip I ve Tip II piretroitler olarak iki gruba ayrılırlar. Tip I piretroitler (alletrin, permethrin, tetrametrin, piretrinler) alfa-siyano grubu içermeyen piretroit esterleridir. Tip II piretroitler (deltametrin, cypermethrin) ise alfa-siyano grubu içerirler (Barlow ve ark., 2001)

Piretroitler vücutta diffüz ettikten sonra, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek ve sinir sistemine hızla yayılım gösterirler. Memelilerde piretroitler karaciğerde detoksifike edilmektedir (Kocaman, 2007). Hedef alınan organizmalarda tam anlamıyla detoksifiye edilemedikleri için, kalıntı ve birikimleri ciddi problemlere yol açmaktadır (Fırat ve Aytekin, 2018).

Piretroitlerin tercih edilme nedenleri, böceklerde oldukça toksik olması, memelilerde sahip oldukları hızlı metabolizma faaliyetlerinden dolayı düşük toksisite göstermesi, zararlılara karşı düşük konsantrasyonlarda geniş bir spektruma sahip olması ve doğada kalıntı bırakmamasıdır (Kocaman, 2007; Mazmancı ve ark., 2008).

Memeliler için toksik etkilerinin az olması nedeniyle piretroit insektisitler tarımsal savaşta, veterinerlikte ve halk sağlığında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada kullanılan insektisitlerin %30'unu piretroit grubu insektisitler oluşturmaktadır (Mazmancı ve ark., 2008).

2.1.2 Piretroitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri

Vücuda diffüz ettikten sonra hızlı bir şekilde sinir sistemine ulaşan piretroitler, nöronların hücre membranına bağlanırlar (Kocaman, 2007). Piretroitlerin, nöronların sodyum iyonu (Na^+) kanallarına ilgileri yüksektir. Na^+ kanallarına gösterdikleri bu afinite nedeniyle açık kalan kanallar, Na^+ akımının sürekli artmasına ve nöronların depolarize kalmalarına neden olur. Piretroitlerin her iki tipi de aynı şekilde etki etmesine karşın, Tip II daha etkilidir. Çünkü Tip I Na^+ kanallarının kısa bir süre açık kalmasına neden olurken, Tip II daha uzun süreli açık kalmasına ve binlerce kez tekrar eden impulslara neden olduğu bildirilmiştir (Barlow ve ark., 2001).

Tip I ve Tip II piretroitlerinin memelilerdeki etki mekanizmaları ve oluşturdukları metabolik bozukluklar farklılık göstermektedir. Tip I piretroitler, hareketsiz kalma, koordinasyon bozukluğu, titreme, aşırı yorgunluk, ataksi, sarsılma, agresif davranışlar ve felç oluşumuna yol açarlar. Tip II piretroitler ise, hiperaktivite, tükürük salgısında artma, kasılma ve titreme nöbetleri, kontrolsüz davranışlar ve felç oluşumuna neden olurlar (Verschoyle ve Aldridge, 1980; Gray, 1985; Tabarean ve Narahashi, 1998; Atamanalp ve Cengiz, 2002).

2.1.3 Neonikotinoitlerin Genel Özellikleri

Neonikotinoit insektisitler, yapılarında nikotin bulunduran ve 6-kloro-3-piridinil grubu ve bunların azometin metabolitleri ve analoglarından oluşurlar (Tomizawa ve ark., 2001). Neonikotinoid pestisitler arasında başlıca imidakloprid (en yaygın kullanılan), asetamiprid, klotiyamid, nitenpiram, nitiazin, tiyakloprid, ve tiametoksam yer almaktadır (Jeschke ve Nauen, 2008). İmidaklopridin ve asetamipridin toprakta kullanımı uygun olmasına karşın, thiaklopridin toprak için kullanımı uygun olmayıp, sadece yapraklar için tescillidir. Bitkiler tarafından rahatlıkla absorbe edilen bu grup pestisitler, birçok böcek türleri, bazı kelebekler ve kın kanatlılar gibi zararlıları mücadele için düşük dozlarda kullanılsa bile hızla etki göstermektedir (Zhao ve ark., 2009)

Memelilerde oral yolla alınan neonikotinoitler, idrar ve dışkı yoluyla atılmaktadır. Bitkilerde ise bu süreç hem metabolik hem de fotokimyasal reaksiyonlara bağlıdır. Bu süreçler metabolizmalarına bağlı olarak aynı veya farklı ürünlerin ortaya çıkmasına yol açabilir (Tomizawa ve Casida, 2005). Literatürde, son yıllarda yaygın olarak kullanılan bu tür tarım ilaçlarının memeli sistemleri üzerindeki kısa veya uzun vadeli etkilerinin araştırıldığı yeterli düzeyde çalışma yoktur.

2.1.4 Neonikotinoitlerin Toksik Mekanizmaları ve Etkileri

Neonikotinoitler, memelilerde ve böceklerde postsinaptik membrandaki nikotink asetilkolin reseptörlerinin özellikle $\alpha 4/\beta 2$ alt ünitesine bağlanmaktadır. Bu durum, ilk olarak kolinerjik sinapslarda hatalı sinaptik geçişlerin artmasına ve bunu takiben sinaps boşluklarında ki nörotransmitter birikimine bağlı olarak sinirsel uyarıların oluşumunun tamamıyla durmasına neden olmaktadır (Kocaman, 2007). Neonikotinoit grubundaki pestisitlerin; böceklerde ve kuşlarda yüksek, memeli ve sucul canlılarda düşük bir toksisiteye sahip olduğu rapor edilmesine karşın, çalışmamızda kullanılan thiaklopridin balıklarda oldukça yüksek bir toksisiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tomizawa ve Casida, 2005).

2.2 Deltametrin

Piretroitler çevrede uzun süre kalan organoflor ve organoklorlu insektisitlere karşı alternatif olarak üretilmiş bir insektisit grubudur. Piretroit grubu bir insektisit olan deltametrin, çevreye zararı en düşük kabul edilen insektisit türlerinden biridir.

Deltametrin Tip II grubu piretreoidir (Soderlund ve Bloomquist, 1989). Geniş spektrumlu olan bu sentetik dibromo-piretroit insektisidinin kimyasal adı, α -siyano-3-fenoksibenzil-(1R, S)- *cis,trans* -3- (2,2-dibromovinil) -2,2- dimetilsiklopropan karboksilat'dır. Karasinek, sivrisinek, hamam böceği gibi ev böceklerinden tarım ürünlerine, özellikle meyve ve sebzelerin karınca, kurt ve kın kanatlılardan korunması için kullanılır (Abdel ve ark., 2013). Böceklere hem larva hem de ergin dönemlerinde toksik etki gösterir. Pestisitlerle karışım halinde yaygın olarak kullanılan insektisit ve fungusitlerle kimyasal olarak uyumsuzluğu yoktur (Hill, 1985). Deltametrin böcekler üzerinde çok hızlı bir şekilde etki gösterdiği için, virüs vektörü olan böceklere karşı kullanılan en önemli insektisitlerdendir. Bu virüsler bitki üzerinde beslenmeye başladıktan birkaç dakika sonra virüs bitkide enfeksiyona sebep olmaktadır. Böylece

böceklerin hızlı bir şekilde ölmesi, virüs dağılımını yavaşlatmaktadır. Bu yüzden deltametrin virüs vektörlerine karşı tercih edilen bir insektisittir.

Deltametrinin, birincil etki mekanizması sinir sistemi üzerinedir (Spencer, 1981; Bhanu ve ark., 2011). Deltametrin sinir hücrelerindeki hücre zarında bulunan sodyum kanallarının normalden daha uzun süre açık kalmasına sebep olmaktadır. Bu etki, hücreye çok miktarda sodyum girmesine ve bunun sonucu olarak da sinir hücrelerinde hipereksitasyon denilen aşırı stimülasyona sebep olmaktadır (Narahashi ve ark., 1992). Sodyum kanalları bütün hayvanlarda bulunduğu için, deltametrin tüm hayvanlara toksik etki göstermektedir. Böceklerin ölümü sinir sisteminin gördüğü zarardan dolayı olmaktadır (Spencer, 1981; Bhanu ve ark., 2011; Timothy, 2012).

Deltametrin çok lipofilik bir kimyasaldır. Bu nedenle organik çözücülerde çözünür, suda çözünürlüğü çok azdır. Lipofilik özelliği nedeniyle hücre zarı aracılığıyla çok çabuk bir şekilde hücre içerisine girebilmektedir. Bu nedenle deltametrinin sodyum kanalları dışındaki zar proteinlerine, hatta hücre içi membran sistemine bile zarar verebileceği tartışılmıştır (Chinn ve Narahashi, 1986; Michelangeli ve ark., 1990).

2.2.1 Deltametrinin Emilimi ve Metabolizması

Laboratuvar sıçanlarında ve farelerinde yapılan çalışmalarda hücreye ağız yoluyla alınan deltametrinin bağırsaklardan süratle emildiği görülmüştür. Sıçanlarda yapılan çalışmalar, bir ester olan deltametrinin hızlı bir şekilde bağırsak duvarında bulunan esteraz enzimleri ve karaciğerde bulunan mikrozomal oksidaz enzimleri tarafından metabolize edildiğini göstermektedir (He ve ark., 1991).

Deltametrin, kemirici hayvanlarda ilk metabolize olduğunda ester bağı kırılarak asit ve alkoller üretilir. Molekülün bazı bölgeleri oksidasyona uğrayabilir. Ester bağı kırıldıktan sonra üretilen alkol ve asit ürünleri ardından sülfürik asit, glisin veya glukuronik asit molekülleri ile konjugasyon reaksiyonlarına girer.

Deltametrin oral yolla vücuda alındıktan 2-4 gün sonra deltametrine ait çoğu metabolitler ve metabolize olmayan deltametrin (toplam alınan deltametrinin yaklaşık %13-21'i) vücuttan dışkı ile atılır. Deltametrinde metabolite olan bir siyano grubu ise, önce tiosiyanide çevrilir ve vücuttan daha yavaş bir şekilde uzaklaştırılır. Bu ürünün mide ve deri yoluyla vücuda alınmasının üzerinden yaklaşık sekiz gün geçtikten sonra

bile, %20'sinin hala vücutta bulunduğu rapor edilmiştir (Myers, 1989; He ve ark., 1991).

İnsanlarda deltametrinin nasıl metabolize olduğu üzerine bilgiler çok kısıtlıdır ancak kemirgenlerdekine benzer şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Deltametrinin insanlarda nasıl absorbe olduğu ve vücuttan nasıl atıldığı üç erkek gönüllü üzerinde çalışılmıştır (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001). Bu gönüllüler radyoaktif ¹⁴C ile işaretlenmiş deltametrini 3 mg'lık tek bir doz halinde ağız yoluyla almışlardır (Myers, 1989; Bhunya ve Pati, 1990; IPCS, 1990). Plazma deltametrin seviyesi, vücuda alındıktan 1-2 saat sonra en yüksek seviyeye çıkmış ve plazmadaki yarı ömrünün 10-11.5 saat arasında olduğu tespit edilmiştir. Salya ve kan hücrelerinde seviyenin çok düşük olduğu görülmüş ve beş gün boyunca %10-26'sının dışı, %50-51'nin idrar yoluyla atıldığı tespit edilmiştir. İdrar ile 24 saatte %90'lık kısmı vücuttan atılmıştır. İdrardaki yarılanma ömrü plazmadakine benzer şekilde 10-13.5 saat olarak tespit edilmiştir. Deltametrinin bir metaboliti olan 3-(2,2-dibromovinil)-2, 2-dimetilsiklopropan karboksilik asit vücutta bulunmuştur. Bu ürün deltametrin kullanan işçilerde de görülmüştür. Bu da ester bağının aynı rodentlerde (kemirgenlerde) olduğu gibi hidrolize olduğunun göstergesidir (Kavlock ve ark., 1979; Barlow ve ark., 2001).

Memelilerle yapılan çalışmalarda, deltametrinin ve thiakloprid metabolitlerinin karaciğerde biriktiği bildirilmiştir (Cole ve ark., 1982; Anand ve ark., 2006). Ayrıca nörotoksisite (Husain ve ark., 1994), alerji ve bağışıklık sistemini baskılaması (Hoellinger ve ark., 1987; Lukowicz-Ratajczak ve Krechniak, 1992), kan-damar hastalıkları (Forshaw ve Bradbury, 1983), üriner sistemde yan etkileri (Issam ve ark., 2009), karaciğerde ve böbreklerde de toksisitesi (Chargui ve ark., 2012) rapor edilmiştir.

2.2.2 Deltametrinin Akut Toksik Etkileri

Deltametrinin sebep olduğu akut toksik etki, vücuda hangi yolla alındığına ve hangi çözücüde çözüldüğüne bağlıdır. Laboratuvar sıçanlarında LD₅₀ değeri 30-140 mg/kg (vücut ağırlığı) olarak bulunmuştur. Minimum toksik doz sadece ağızda sulanmaya sebep olan 10 mg/kg'dır (Poonam ve ark., 2013). Farelere ağız yoluyla sıvı yağda ya da polietilen glikol içerisinde çözünerek verilen deltametrinin LD₅₀ değeri 1-34 mg/kg (vücut ağırlığı) olarak rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 1991). Sıçanlara çözelti

içerisinde verildiğinde deltametrinin 15.000 mg/kg vücut ağırlığında dahi ölüme sebep olmadığı rapor edilmiştir. Benzer olarak köpeklere verilen 300 mg/kg vücut ağırlığı kapsüller halinde ve sıçanlara verilen 800 mg/kg vücut ağırlığı dermal uygulamalar şeklindeki ve tavşanlara verilen 2000 mg/kg vücut ağırlığı polietilen glikolde çözülmüş deltametrinin ölüme sebep olmadığı gösterilmiştir. Ancak motor koordinasyonda yavaşlamaya, vücutta titremelere, solunum güçlüğüne, kramplara, hayvanların havale geçirmesine, hiper duyarlılığa ve hiperaktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir (IPCS, 1990; Zhang ve ark., 1991; Poonam ve ark., 2013).

2.2.3 Deltametrinin İnsanlara Olan Toksik Etkileri

Deltametrinin insanlara olan akut toksik etkisi ile ilgili raporlar, birkaç istisna dışında iş sebebiyle deltametrine maruz kalan zirai mücadele işçileriyle yapılan çalışmalarla sınırlıdır.

İntihara teşebbüs eden 13 yaşındaki bir kız çocuğunun 5 g deltametrin içtiği rapor edilmiştir. Çocukta bilinç kaybı, kramplar, miyosis (göz bebeği küçülmesi) ve taşikardi gözlenmiştir. Hastane çocuğun 48 saat içerisinde tümüyle iyileşerek taburcu edildiğini rapor etmiştir (Bhunya ve Pati, 1990; IPCS, 1990). Başka bir olayda 1.75 g deltametrin içen 23 yaşındaki bir şahısta hiçbir nörolojik hasar olmadığı gözlenmiştir (Barlow ve ark., 2001).

Deltametrin kullanan işçilerin rapor ettikleri sorunlar genelde deride yanma, uyuşukluk ve karıncalanma hissi şeklindedir. Başka bir raporda ise işçilerin bacaklarında, ağızda ve dilinde parestezi (karıncalanma hissi) ve ishal rapor edilmiştir. Karıncalanma hissi 24 saat süreyle süreklilik gösterirken, 48 saatin sonunda tümüyle yok olduğu rapor edilmiştir (Bhunya ve Pati, 1990; IPCS, 1990; Barlow ve ark., 2001). Bu raporlara ek olarak Çin’de koruyucu giysi olmadan deltametrin ile çalışan pamuk işçilerinin %90’ının, deri sorunları, şiddetli baş ağrısı, yorgunluk, kusma ve şiddetli iştah kaybı yaşadığı rapor edilmiştir (Ruzo ve ark., 1978; Bhunya ve Pati, 1990; Hayes ve Laws, 1990).

2.2.4 Deltametrinin Genotoksik Etkileri

In vitro mutajenite testleri (bakteri testleri, Saccharomyces testleri ve insan hücreleri testleri) deltametrinin mutajenik etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak yapılan *in vivo* testlerde El-Gohary ve ark., (1999) ve Eriksson ve Fredriksson, (1991)

deltametrinin mikronükleus oluşumuna, kromozom anormalliklerine sebep olduğunu ve sperm morfolojisinde anormalliğe sebep olduğunu rapor etmişlerdir (Eriksson ve Fredriksson, 1991; El-Gohary ve ark., 1999). Ancak araştırmacılar, deltametrinin kuvvetli bir mutajen veya klastojen olmadığı konusunda fikir birliğindedirler (Tucker, 1994; Descotes, 2000; Gupta, 2012)

Literatürde bulunan bu çalışmalar deltametrinin insanlar üzerindeki toksisitesinin yüksek olmadığına, bu nedenle güvenli bir pestisit olduğuna işaret etmektedir. Bu da deltametrinin yoğun kullanılan bir pestisit olmasına katkıda bulunmaktadır.

2.3 Thiakloprid

Thiakloprid, neonikotinoid grubu içerisinde olan ve bitkiyi delerek özünü emen haşerelere karşı kullanılan sentetik bir insektisittir (Tomizawa ve Casida, 2005). Çok yaygın olarak kullanılan bu insektisit, geniş spektrumludur. Bitkilerin vasküler (floem ve ksilem) dokusu tarafından emilir ve bitkinin her bölgesine yayılır. Bu nedenle bitkiyi delerek özünü emen haşerelere çok çabuk etki gösterir (Maienfisch ve ark., 2001). Diğer nikotin grubu insektisitler gibi bitkinin merkezi sinir sistemini nikotinic asetil kolin esteraz reseptörlerine bağlanarak etkilemektedir. Reseptörlere bağlanması hücre ve dokularda asetil kolin birikmesine ve daha sonra felce sebep olmaktadır (Zhang ve ark., 2000; Iwasa ve ark., 2004). Nikotin grubu içerisinde olmalarına rağmen insanlarda nikotin ve türevlerinin gösterdiği toksik etkiyi göstermemekte, bu nedenle yaygın olarak kullanılmaktadır (Tomizawa ve Casida, 2003). Ayrıca haşerelerin thiaklopride karşı kros-tolerans göstermedikleri de gözlenmiştir. Örneğin hidrokarbonlu, karbonatlı, ve organofosforlu insektisitlere karşı dayanıklı olan haşereler, thiaklopride dayanıklı değildir. Bundan dolayı, bu insektisitler yerine yaygın olarak kullanılmaktadır (Denholm ve ark., 2002).

Yaygın kullanılmasına sebep olan bütün bu avantajlara karşın, balıklarda akut toksisiteye sebep oldukları rapor edilmiştir (Tomizawa ve Casida, 2005). Yapılan bazı araştırmalar thiaklopridin arılar tarafından hızlı bir şekilde metalaşır edildiğini, bu nedenle arılara karşı toksik etkisi olmadığını ileri sürmektedir. Ancak subletal dozdaki thiaklopridin bile, arılarda yüksek mortaliteye sebep olduğu gösterilmiştir (Vidau ve ark., 2011). Sıçanlarda yapılan kısa ve uzun süreli ağız yoluyla thiakloprid alımı, sıçan karaciğeri ve tiroit bezinde etkilere sebep olmaktadır (Aydın, 2011). Thiakloprid hem

yalnız hem de deltametrin / thiakloprid karışımı şeklinde verildiğinde sıçanların lenf organlarında ve plazmada antioksidan enzim seviyesinde azalmaya sebep olduğu rapor edilmiştir (Aydın, 2011). Yüksek nitrik asit myeloperoksidaz enzim aktivitesini artırmakta, polinükleer lökositlerde karbonil seviyesini arttırmakta ve lipit peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Bu artış, hücrelerde peroksinitrit ve hidroksil radikallerinin oluşmasına; bu nedenle oksidatif strese, DNA hasarına ya da apoptosise sebep olmaktadır (Barthwal ve ark., 1999). Thiakloprid'in DNA da hasarlara sebep olması mutajenik etkisinin araştırılması için deneyler yapılmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar thiaklopridin, *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 ve TA1537) ya da *Escherichia coli* (WP2uvrA) üzerinde mutajenik etkisi olmadığını ve Cin hamstırlarının H RTP lokusunda mutasyona sebep olmadığını ve farelerde mikronükleus oluşumuna sebep olmadığını gösterilmiştir (WHO, 2006).

Vücut üzerindeki etki mekanizmalarının oksidatif strese ve DNA hasarına sebep olması nedeniyle, neonikotoid pestisitlerin genotoksik ve karsinojenik etkilerini araştıran pek çok çalışma vardır (Zhang ve ark., 2000; Feng ve ark., 2005; Karabay ve Oğuz, 2005; Kocaman ve Topaktaş, 2007). Ancak thiaklopridin sitotoksik etkilerini araştıran yayın sayısı kısıtlıdır. Şekeroğlu ve ark., (2011) tarafından yapılan bir *in vivo* araştırmada thiaklopridin mitotik indeksi düşürdüğü ve binükleer hücre sayısını ve kromozom anormalliklerini artırdığı rapor edilmiştir.

2.3.1 Thiaklopridin Emilimi ve Metabolizması

Thiakloprid, sinir sisteminde bulunan postsinaptik reseptörlerden asetil kolin reseptörlerine bağlanarak, liganların reseptörlere bağlanmasını engellemektedir (Matsuda ve ark., 2005, 2009). Bu bağlanma, geri dönüşümü olmayan bir bağlanmadır. Kasların aşırı derecede stimule olması nedeniyle, felce ve daha sonra ölüme sebep olmaktadır (Yamamoto, 1999; Vo ve ark., 2010; Easton ve Goulson, 2013). Neonikotoid insektisitlerin nikotinden farkı, bütün neonikotoidlerin içerdiği ortak bir özelliktir; bu insektisitler ya bir nitroimine, nitrometilen, veya siyanoimin içermektedir. Bu yan gruplar, reseptörlerde bulunan özel amino asitlerle bağlantı kurmaktadır. Bu nedenle neonikotoid insektisitler sadece böceklere toksik etki yapmakta, diğer canlılarda bulunan asetil kolin reseptörlerine bağlanmamaktadır (Tomizawa ve Casida, 2005). Tarımsal olarak neonikotoidler tohumlara uygulanmakta, tohum büyürken insektisiti bünyesine almakta ve böylece bitkiyi

delerek emen böceklere karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Avrupa Birliği Ülkeleri, 2013 yılından itibaren bazı neonikonoidlerin arılarda koloni göçerten hastalığına sebep olduğunu ileri sürerek yasaklanmıştır (Fischer ve ark., 2014; Williams ve ark., 2015). Diğer araştırmacıların neonikonoidlerin hedef olmayan omurgasız organizmalara toksik olduğunu yayınlaması üzerine (Pisa ve ark., 2015), yasaklar daha da sıkılaştırılmıştır. Ancak thiaklopridin toksisitesi düşük olduğu için yasaklama getirilmemiştir (Iwasa ve ark., 2004). Bir çalışmada, thiaklopridin sadece balıklara toksik olduğu iddia edilse de (Schmuck, 2001), Thiaklopridin toksisitesi henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Thiakloprid doğada uzun süreli kalan bir insektisittir. 290 nm üzerindeki ışığı absorbe etmediği için, ışığa dayanıklıdır (Peña ve ark., 2011) ve ışık altında kimyasal olarak bozulmaz, yani fotolize karşı dayanıklıdır (Gupta ve ark., 2008). Bu nedenle de çevrede çok uzun süre bozunmadan kalabilir (Černigoj ve ark., 2007). Thiaklopridin doğadaki yarılanma ömrü toprakta 19.1 gün olarak tespit edilmiştir (Goulson, 2013). Bu uzun ömürlü organizmaların thiaklopride, uzun süreli düşük dozlarda maruz kalmasına sebep olmaktadır. Ancak bu uzun süreli etkinin düşük dozlarda organizmaların DNA'sını nasıl etkilediği çok iyi bir şekilde anlaşılamamıştır.

2.4 DNA Hasarları

Hücrelerin genetik materyali olan DNA, sürekli olarak genotoksik maddelere maruz kalmaktadır. Bu genotoksik maddelerin bir kısmı, aflatoksin, alkilleyici ajanlar, benzopiren gibi kimyasal veya UV radyasyon ve iyonize radyasyon gibi fiziksel olan ekzojen etkenlerdir. Ekzojen etkilerin yanı sıra yanlış eşleşmeden dolayı meydana gelen inversiyonlar ve delesyonlar, deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler, depürinasyon ve depirimidinasyon gibi baz kayıpları ve oksidatif hasar gibi endojen etkenler de vardır (Hoeijmakers, 2001; Friedberg ve ark., 2005). Adı geçen bu hasarlar, gen diziliminde ya da kromozom yapısında mutasyon adı verilen değişikliklere sebep olabilirler. Mutasyonlar; bir veya birkaç bazın sırasının yer değiştirmesi, kopması, ya da zincire yeni bazların eklenmesi gibi gen mutasyonları; kromozomların bir parçasının kopması, duplike olması, ya da ters dönmesi gibi kromozom yapı mutasyonları; ya da kromozom sayısında değişikliğe sebep olan kromozom sayısı mutasyonları şeklinde olabilir.

Mutasyonlar organizmalarda görülen tür içi ve türler arası çeşitliliğin ana sebebidir. Bir mutasyonun canlılar alemindeki çeşitliliği etkilemesi ancak bu mutasyon bireyin gametlerinde ortaya çıkacak olursa görülecektir. Eğer mutasyon somatik hücrelerde görülecek olursa evrimsel açıdan bir önemi olmayacak, yalnızca mutasyonun ortaya çıktığı hücreyi etkileyecektir (Friedberg ve ark., 2005).

Hücrenin genetik materyali olan DNA'nın en önemli fonksiyonlarından birisi, protein sentezinden sorumlu olmasıdır. Proteinlerin yapısı ve fonksiyonunu belirleyen protein dizilimi bilgisi, DNA dizilimi içerisinde taşınmaktadır. Dolayısıyla DNA'nın diziliminde olan değişiklikler protein diziliminde ve bunun sonucu olarak da protein yapısında değişikliğe sebep olmaktadır.

Proteinler, hücrelerin temel yapı taşıdır ve çok çeşitli biyolojik fonksiyonları vardır. Örneğin hormonlar (insülin, şeker metabolizmasında rolü olan bir hormondur), transport proteinleri (hemoglobin, oksijen taşınmasından sorumlu olan bir transport proteindir), savunma mekanizması proteinleri (antibodiler, yılan zehiri vs. savunma proteinleridir), enzimler (amilaz, lipaz gibi sindirimden sorumlu proteinler), ve DNA tamir proteinleri (ataksia-telangiectasia mutated = ATM), histon varyant (H2AX DNA hasar tamirinden sorumludur) bazı önemli protein gruplarıdır. Eğer bu proteinlerin diziliminde fonksiyonlarını engelleyecek bir değişiklik olursa, genelde bu mutasyonlar apoptosise sebep olarak hücrenin ölümüne yol açarlar. Ancak bu mutasyonların, hücrenin önemli metabolik işlevlerine zarar vermesi ve bireyin yaşamını tehlikeye atması da mümkündür. Örneğin hücre bölünmesinin kontrolünden sorumlu proteinlerin yapımında görevli genlerde ya da DNA hasarının onarımından sorumlu proteinlerin genlerinde görülen mutasyonlar, kansere sebep olarak bireyin yaşamını tehlikeye atabilir. DNA dizilimindeki bu hatalar spontan ya da eksogenik etkenler dolayısıyla meydana gelebilir. Hücreler, her gün pek çok mutasyona sebep olan dış etkenlere maruz kalmaktadır. Bu nedenle DNA hasarlarının çabucak tamir edilerek hasar nedeniyle meydana gelen zararının minimuma indirilmesi çok önemlidir (Atamanalp ve Cengiz, 2002).

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde, ökaryotik hücreler DNA Hasar Tepkisi (DHT) adı verilen kompleks bir hücre sinyal transdüksiyon ağını harekete geçirirler (Harper ve Elledge, 2007). Bunların bazı örnekleri baz eksizyon tamiri (Base Excision

Repair = BER), yanlış eşleşme tamiri (Mismatch Repair = MMR), nükleotid ekzision tamiri (Nükleotid Excision Repair = NER), homolog rekombinasyon (Homologous Recombination = HR), ve non-homolog uç eşleştirme (Non-Homologous end-Joining = NHEJ) mekanizmalarıdır (Kennedy ve D'Andrea, 2006).

Bu ağların her biri, farklı çeşit DNA hasarının tamirinden sorumludur (Şekil 2.1). Örneğin BER, küçük lezyonların tamirinden sorumludur. Genellikle deamine olmuş sitozin bazları, deamine olmuş adenin bazları ve alkillenmiş veya oksitlenmiş bazlar BER mekanizması ile tamir edilirler. NER tamir ağı, UV radyasyon sonucunda oluşan ve genellikle büyük olan lezyonların tamirinden sorumludur (Cohn ve Alan, 2008).

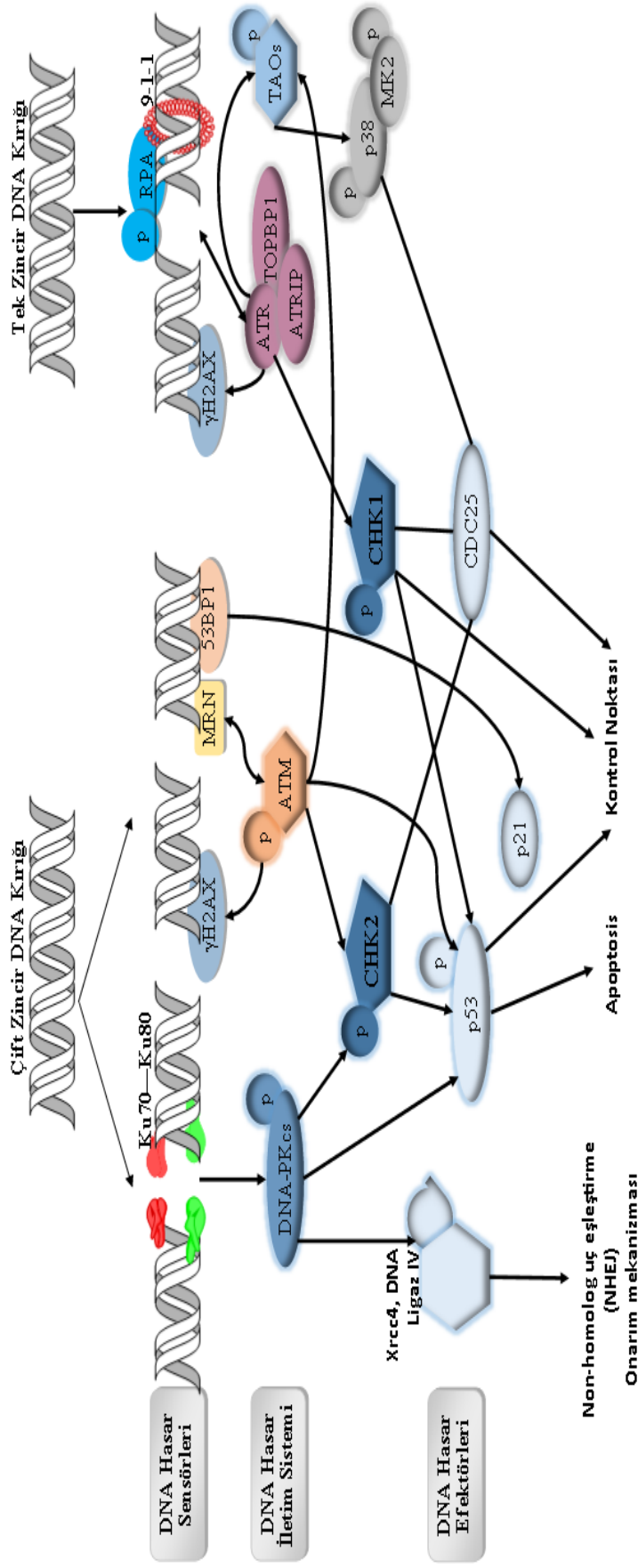
NER, genellikle hücre döngüsünün G1 aşamasında görev alır. MMR, replikasyon sırasında görülen yanlış eşleme tamirlerinden sorumludur. Bu genellikle sitozinin deamine olarak, timin bazına dönüşmesi sonucu ortaya çıkan geçiş mutasyonunun tamirinde ve insersiyon/delesyon döngülerinin tamirinden sorumludur. HR ve NHEJ tamir ağları ise, DNA çift zincir kırıklarının tamirinden sorumludur. Çift kırık hasarları radyasyon ve kimyasallar gibi ekzojen ya da reaktif oksijen türevleri, replikasyon çatalı hataları gibi endojen kaynaklı olabilir (Cohn ve Alan, 2008).

Adı geçen mutasyonlar içerisinde en tehlikeli olan mutasyon çeşidi DNA'da görülen çift zincir kırılması mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, çift zincirli DNA'nın iki iplikçığının de aynı anda kırılması sonucu meydana gelir. Hücre içerisinde DNA hasarlarını tamir eden özel DNA tamir mekanizmaları vardır. Çift zincir kırılması sonucu meydana gelen DNA hasarı, onarımı en zor ve nadir görülen onarım çeşitidir. Bunun ilk ve en önemli sebebi; DNA'nın her iki zinciri de kırıldığında kopan kromozom parçalarının tamir mekanizması başlamasına fırsat bulamadan, fiziksel olarak birbirinden ayrılmasıdır. Kromozom parçaları birbirinden uzakta olduğu için DNA ligasyonu mümkün olmamaktadır. Kopan kromozom parçalarının birbirinden uzak olması, bu parçaların başka bir kromozomla ligasyona uğramasına ve bu nedenle translokasyon tipi mutasyonların görülmesine sebep olur. İkinci bir sebep ise; DNA kırığının olduğu bölgede meydana gelen baz sırası değişiklikleridir. Bu demektir ki; DNA polimeraz enzimi ya da nükleazlar, DNA'nın uçlarını tamir etmeyi bitirmeden çift kırık onarımına başlamak mümkün olmayacaktır. Bu nedenle DNA çift zincir kırıkları, genelde ya proteinlerde sebep olduğu değişiklik nedeniyle hücre

metabolizmasında değişikliğe, ya apoptosis aracılığı ile hücre ölümüne (Rich ve ark., 2000) ya da hücre bölünmesindeki kontrol ortadan kalktığı için kansere neden olurlar (Lengauer ve ark., 1998; van Gent ve ark., 2001; Khanna ve Jackson, 2001).

Şekilde 2.1’de görüldüğü gibi DNA’da çift kırık olduğunda ilk olarak DNA çift kırık (DSB) hasar tespit proteinleri bu kırığı tanıyarak sinyal iletim proteinlerini harekete geçirirler. Bu proteinler, çeşitli kinaz sinyal iletişim proteinlerini aktive ederler. Kinaz sinyal proteinleri, sinyali hem amplifikasyon hem de diferensiyasyon yoluyla diğer hücre birimlerine iletirler. Bu iletişim, hücrenin DSB hasarına vereceği tepkiyi belirler (Şekil 2.1). DSB’nin hücreye verdiği zararın ölçüsü ve hatta hücre ölümüne bile sebep olabileceği göz önüne alındığında, hücre tepki sistemlerinin normal koşullarda hücrede inaktif tutulması ve bir hasar olduğunda çok hızlı, hassas ve seçici olarak harekete geçirilmesi gerektiği görülür.

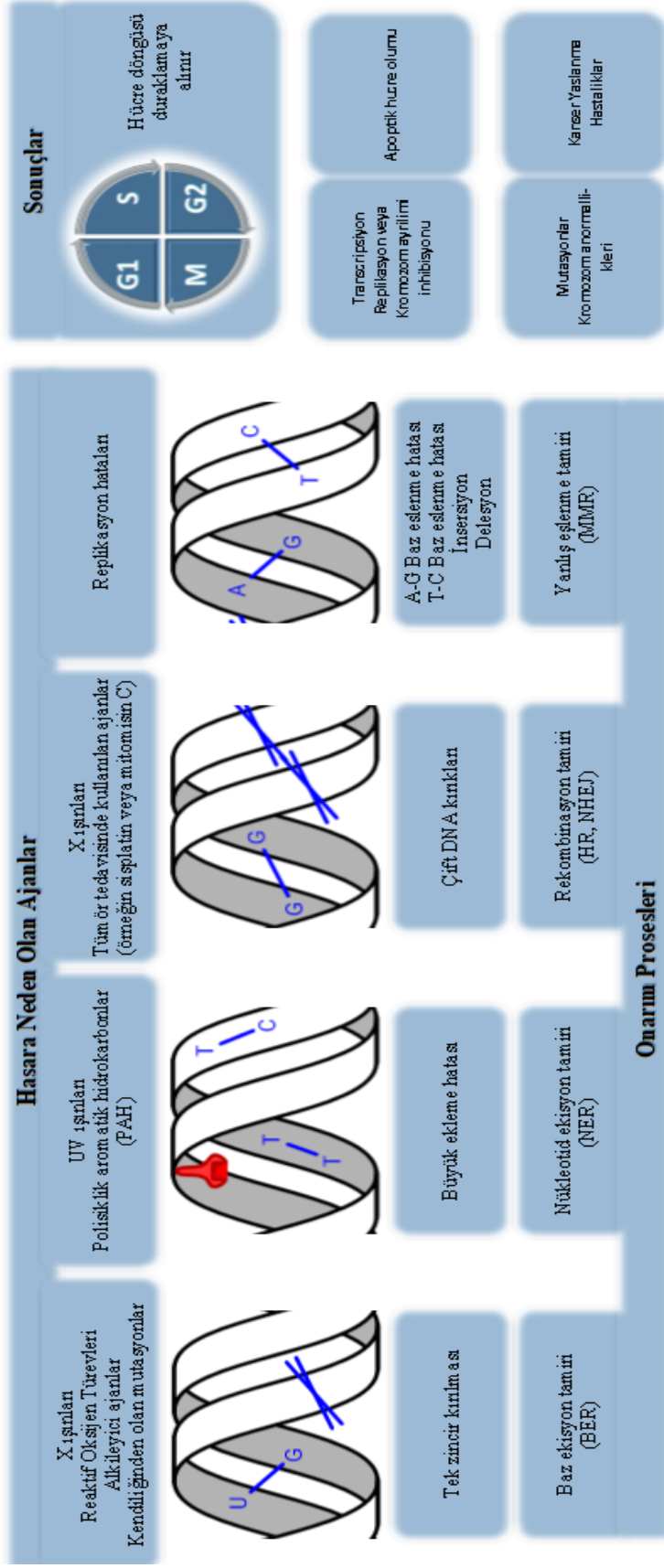
DNA çift kırıklarına gösterilen tepkilerden birisi, DNA hasar tamir proteinlerinin aktive edilmesidir. Bu durumda tamir proteinleri hasar bölgesine gelerek tamir işlemini başlatırlar. (Şekil 2.2). Bölünme safhasında olan hücrelerde DSB tamirinin ilk aşaması hücre döngüsünün yavaşlatılmasıdır. Hücrenin G1’den S fazına girişi engellenir, eğer hücre S fazındaysa bu faz içerisindeki ilerlemeler yavaşlatılır. Bu yavaşlama, DNA polimeraz replikasyonu başlatmadan önce DNA tamirinin tamamlanması için hücreye zaman kazandırır. Eğer hasar G2 fazında görülürse, hücrenin mitoz bölünme fazlarına girmesi engellenir. Bu durumda, sitokinez öncesi görülen kromozom segregasyonunda olacak hatalar önlenmiş olur (Zhou ve Elledge, 2000; Khanna ve Jackson, 2001; Bartek ve ark., 2001).



Şekil 2.1 DNA Hasarı Sonucunda Aktive Olan Biyokimyasal Ağlar

ATM, ATR ve DNA-PK sinyal ağlarının DNA çift kırığı tamirindeki rolleri. DNA-PK, ATM ve ATR mekanizmaları DNA'da çift zincir kırıklarının onarımında rol alan tamir mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalardan iki tanesi (ATM ve ATR) kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri olan nükleozomlardaki histon molekülü H2A'nın varyantlarından birisi olan H2AX proteinini fosforile ederek DNA tamirini başlatır. H2AX proteinin işlevi DNA-PK sinyal ağını bu da non-homolog uç eşleştirme (NHEJ) onarım mekanizmasını başlatır. DNA'nın kırık olan uçları KU heterodimer proteinleriyle kaplanır. Bu proteinler fosforile olmuş DNA-PK molekülünü bölgeye getirirler. Bu kompleks DNA Ligaz IV-Xrcc4 kompleksi aracılığı ile kopuk olan iki DNA zincirinin bağlanmasını sağlar.

©Viruses 2014, 6, 2155-2185; doi:10.3390/v6052155



Şekil 2.2 DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Sonuçları

Hasara Neden Olan Ajanlar: Yaygın olarak DNA hasarına sebep olan maddeler (üst), Bu maddeler tarafından meydana gelen DNA hasarlarının örnekleri (orta). Bu hasarların onarımından sorumlu olan hücresel mekanizma. (alt).

Sonuçlar: DNA hasarının hücre döngüsüne olan etkisi. Hücre döngüsü G1, S, G2 veya Mitoz sırasında duraklamaya alınır (üst) ve DNA ile ilgili hücrel olaylar (mesela replikasyon) durur ve hücre apoptotik hücre ölümüne maruz kalır (orta). Hücre hasara sebep olan maddelere uzun süreli maruz kalırsa DNA hasarları hücrede nokta mutasyonu ya da kromozom anomalileri gibi mutasyonlarla karşılaşır (alt)

©2001 Nature Publishing Group Hoeijmakers, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature411, 366–374 (2001). All rights reserved

2.5 Pestisitlerin Genotoksik Etkileri

Heterojen grupta kimyasal pestisitler, çağımızda en yaygın kullanılan kimyasallardan birisidir. Haşereler, yabancı otlar gibi istenilmeyen organizmaların öldürülmesi ve uzaklaştırılması için kullanılırlar (WHO, 2016). Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde toplam olarak 1 140 organik ve inorganik kimyasal, pestisit aktif maddesi olarak kullanılmaktadır (EPA, 2016). Dünya çapında düşünüldüğü zaman bu sayının daha çok artacağı açıkça ortadadır. Kimyasal yönden çok çeşitlilik gösterdikleri için pestisitlerin kendilerine maruz kalan organizmalara karşı da çok çeşitli etkiler gösterecekleri kesindir. Bazı rapor edilen zararlı etkiler;

- Parkinson hastalığı gibi nörolojik hastalıkları (Sanders ve ark., 2017),
- Astım gibi solunum yolları hastalıklarını (Phua ve ark., 2009),
- Şeker hastalığı ve obezlik gibi metabolik hastalıkları (Everett ve ark., 2018),
- Gelişim bozukluklarını (Hoy ve ark., 2015),
- Lösemi gibi çocuk kanserlerini (Ma ve ark., 2002; Belson ve ark., 2007),
- Konjenital kalp bozukluğunu (Carmichael ve ark., 2014),
- Nöral tüp bozukluklarını (Yang ve ark., 2014),
- Otizm spektrum hastalıklarını (Autism Spectrum Disorders = ASD) (Keil ve ark., 2014) kapsamaktadır.

Bu hastalıklara ek olarak pestisitlerin genotoksik etkileri, toksikolojik (Gonzalez-Mille ve ark., 2010) ve epidemiyolojik olarak gösterilmiştir (Gomez-Arroyo ve ark., 2000; Bolognesi, 2003; Bull ve ark., 2006; Martinez-Valenzuela ve ark., 2009; Bolognesi ve ark., 2009). Ayrıca hayvan modellerinde *in vivo* olarak yapılan çalışmalar (Dzwonkowska ve Hubner, 1986; Farah ve ark., 2006; Prasad ve ark., 2009; Martinez-Paz ve ark., 2013) ve *in vitro* çalışmalar (Gonzalez ve ark., 1990; Gómez-Arroyo ve ark., 1995; Tisch ve ark., 2002; Tisch ve ark., 2005; Ündeğer ve Başaran, 2005; Bajpayee ve ark., 2006; Lin ve ark., 2007; Manas ve ark., 2009; Rojas-Garcia ve ark., 2009; Türkez ve Toğar, 2011; Koller ve ark., 2012; Alvarez-Moya ve ark., 2014) kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus testi (MN), kromozom anormallikleri testi ve DNA kırıkları gözlemlenerek gerçekleştirilmişlerdir. Ayrıca bazı çalışmalar pestisitlerin sebep olduğu lösemi hastalığının translokasyonlar sonucu olduğunu göstermektedir (Alexander ve ark., 2001; Kim ve ark., 2006; LaFiura ve ark., 2007). Bu translokasyonların bir kısmı t(4;11), t(8;21), ve t(12;21) olarak gösterilmiştir

(Greaves ve Wiemels, 2003; Pui, ve ark., 2004). Bu tip translokasyonlar genellikle çift DNA kırıklarının oluşması sonucu başlayıp, daha sonra çift DNA kırığı tamir mekanizmalarının (HR ve NHEJ) doğru işlem görmemesini takiben translokasyon mutasyonu ile sonuçlanmaktadır (Aplan, 2006; Zhang ve Rowley, 2006).

Suárez-Larios ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada; günümüzde yaygın olarak kullanılan sekiz pestisitinin çift DNA kırıklarının oluşmasına sebep olup olmadığını incelemişler, bunların beş tanesinin (Glifosat, Permetrin, Pentaklorofenol, Endosülfan lakton ve Paraokson) lenfosit kültürlerinde Rad51 proteini oranını artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu protein, homolog rekombinasyon tamirinde rol alan bir proteindir. Ayrıca NHEJ mekanizmasında rol alan p-Ku80 proteininin de arttığını gözlemlemişlerdir (Suárez-Larios ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Aletler

3.1.1 Biyogüvenlik Kabini

Hücre kültürlerinin ekimi ve test solüsyonlarının hazırlanması kontaminasyonu engellemek için biyogüvenlik kabini içerisinde steril bir ortamda yapılmıştır. Laboratuvarımızda ESCO Class II biyogüvenlik kabini kullanılmaktadır. Biyogüvenlik kabini deneylere başlamadan önce ilk olarak 30 dakika süreyle UV ışınla daha sonra %70'lik etanol ile sterilize edilmiştir. Deneyler bittikten sonra kabin %70'lik etanol ile silinmiş ve daha sonra 30 dakika süreyle UV ışınla sterilize edilmiştir.

3.1.2 Karbondioksit (CO₂)'li İnkübatör

Hücrelerin çoğaltılması ve kültürün devam ettirilmesi için CO₂'li inkübatör kullanılmıştır. CO₂'li inkübatör; hücreleri optimum sıcaklık, nem ve pH altında tutmaktadır. Yapılan çalışmalar hücre kültürü mediumunda pH bikarbonat tamponu kullanarak sabit tutulacak olursa hücrelerin daha sağlıklı olduğunu göstermiştir. Bu tampon sistemi kandaki tampon sisteminin aynısıdır. Hücrelerdeki asit-baz dengesini sağlamak için inkübatöre CO₂ verilir. Bu CO₂, kültür mediumunda bikarbonat ve hidrojen iyonlarına ayrışacak olan karbonik asiti (H₂CO₃) oluşturur. Çalışmalarımızda Memmert Une 400 model CO₂ inkübatörü kullanılmıştır. İnkübatörün neminin, içerisinde steril su bulunan bir kabin sayesinde sürekli sabit kalması sağlanmıştır.

3.1.3 Hassas Terazı

Kimyasal malzemeler Radwağ marka AS 220 R2 model hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Hava akımından dolayı ortaya çıkacak tartım hatalarını engellemek için cam paravanlı koruyucuları olan terazi kullanılmıştır.

3.1.4 Santrifüj

Hücre süspansiyonlarındaki hücreleri çöktürmek amacıyla MPW- marka MPW-351R model santrifüj kullanılmıştır.

3.1.5 Hücre Sayım Cihazı

Çalışmalarımızda kullanılan hücreler, masa üstü İnvitrogen Cell Counter marka MP10227 model hücre kültür sayımı cihazı ile sayılmıştır. Standard Tripan Mavisi

boyama yöntemini kullanarak canlı, ölü ve toplam hücre sayılarını ve hücre canlılığı oranlarını otomatik olarak belirlemekte ve sayımlarda tutarlılık temin etmektedir.

3.1.6 Mikroskoplar

Çalışmalarımızda hücre kültürleri devam ederken, hücre karakterizasyonu ve davranışları ile DNA çift kırıklarının incelenmesi için mikroskoplar kullanılmıştır

3.1.6.1 İnvirt Mikroskop

Leica marka DM IL LED model mikroskop kültür kaplarının, çok kuyucuklu plakaların ve bölmeli lamların incelenmesinde kullanılmıştır. İnvirt mikroskop göz merceği 10X, objektif mercekleri ise 10X, 20X ve 40X büyütme özelliğine sahiptirler. Bu mikroskopla yapılan hücre özelliklerinin ve kültürün izlenmesinde hücreler 100–400 kat oranında büyütülerek izlenmiştir.

3.1.6.2 Floresan Filtreli Işık Mikroskobu

Floresan filtreli ışık mikroskobu, ko-lokalizasyon testlerinde kullanılmıştır. Ko-lokalizasyon testinin amacı, DNA çift zincir kırılmalarının gözlenmesidir. DNA'nın yapısında bulunan bir histon protein olan H2AX ve DNA'nın iki zincirinde birlikte kırılma hasarı olduğu zaman, kırık üzerine gelen 53BP1 proteininin gözlenmesi için kullanılmıştır. Bu proteinleri işaretlemek için, Alexa Fluor 488 ve Alexa fluor 555 immünofloresan boya kullanılmıştır. Bu boyalar sadece floresan filtrelerle görülebilmektedir. Leica marka DM2500 model floresan mikroskop, DNA lezyonu odaklarının görüntülenmesi ve sayımı için kullanılmıştır.

3.1.7 Mikroplaka Eliza Okuyucu

Kullanılan kimyasalların sitotoksik etkileri, hücre canlılığı oranını ölçen MTT testi ile belirlenmiştir. MTT testi, metabolik aktivite temelli bir hücre proliferasyon (Hücrelerin çoğalması) testidir. 96-kuyucuklu plakalarda üretilen hücrelerin proliferasyonu, BioTek marka Elx800 model mikroplaka okuyucusu da absorbans değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.1.8 Vorteks Karıştırıcı

İnsektisit solüsyonları uygulama öncesinde Stuart marka SA8 model Vorteks karıştırıcı kullanılarak, dairesel salınımlı hareketlerle homojenize edilmiştir.

3.1.9 Su Banyosu

Solüsyonlar uygulama öncesi Daihan marka WB22 ve JSR JSWB model su banyoları içerisinde ısıtılarak optimum sıcaklığa getirilmiştir. Kontaminasyonu önlemek için su banyosunun suyu düzenli olarak haftada bir değiştirilmiş ve içerisine fungus üremesini engelleyici kimyasal Clear Bath eklenmiştir.

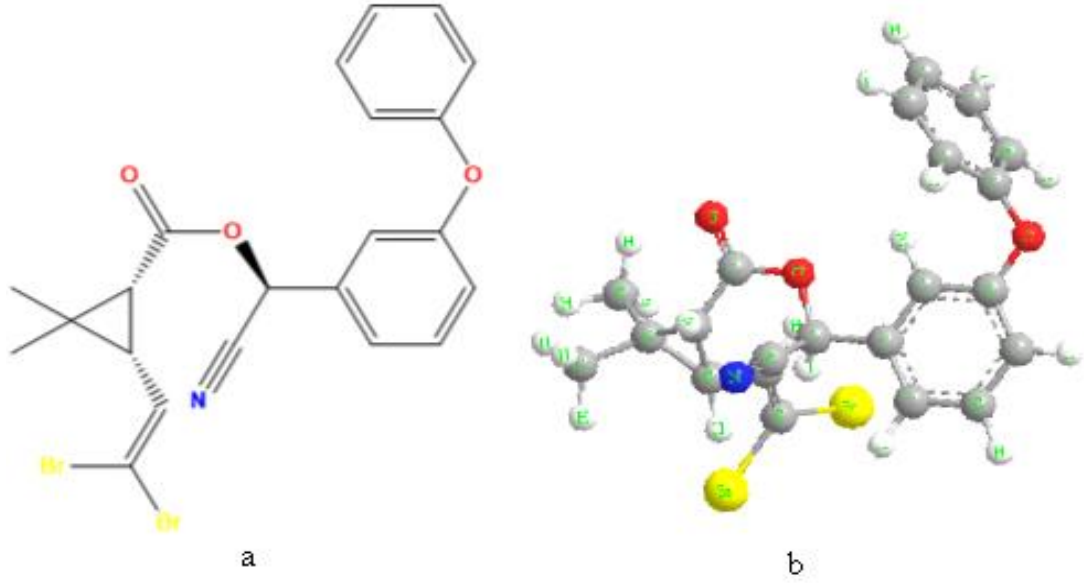
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.2.1 İnsektisitler

Çalışmalarımızda insektisitlerin etken maddeleri (Deltametrin-Thiaklopid) kullanılmıştır.

3.2.1.1 Deltametrin (SIGMA)

Kimyasal Adı:	[S]-alphacyano-3-phenoxybenzyl-[IR]-cis-3-[2,2-dibromovinyl]-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate
Ticari Adı:	Agmetrin, Atacis, B-Katrina, Caracole, Cislin, Crackdown, Decan, Decis, Dedare, Dekagard, Delete, Delpaz, Delphine, Delta, Deltabiol, Deltagurcis, Deltasis, Deltharin, Deltis, Demond, Depar, Derris, Deşarj, Global Fixmethrin, Grandthrin, Impamethrin, Keshet, Kulderin, Lenadectina, Nikriz, Serdesiz, Topraxdel, Parole, Patriot, Zodiac.
Ampirik Formulu:	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$
Molekül Ağırlığı:	505.206 g/mol
Erime noktası:	98 °C (208 °F; 371 K)
Buhar basıncı:	9.3×10^{-11} mm Hg (25 °C)
Çözünürlük:	Suda çözünmez (20 °C)



Şekil 3.1 Deltametrin (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü

3.2.1.2 Thiaklopid (SIGMA)

Kimyasal Adı: [3-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-2-thiazolidinylidene] cyanamide

Ticari Adı: Bariard, Biscaya, Calypso.

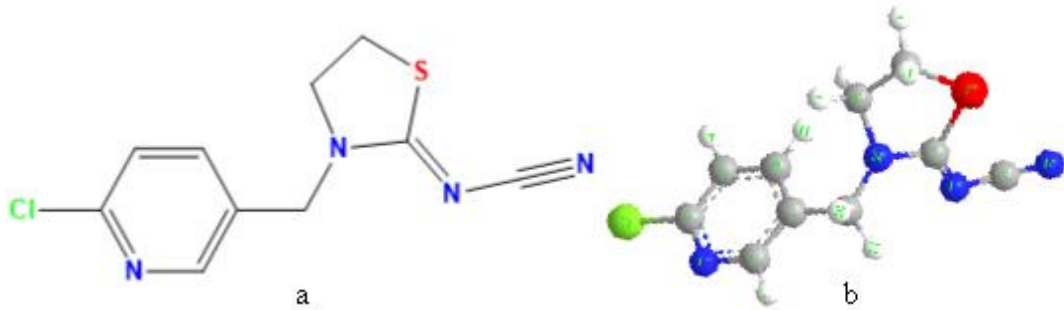
Ampirik Formülü: C₁₀H₉ClN₄S

Molekül Ağırlığı: 252.72296 g/mol

Erime noktası: 136 °C (277 °F; 409 K)

Buhar basıncı: 6.0 x 10⁻¹² mm Hg (20 °C)

Çözünürlük: Suda 185 mg/L at (2 °C)



Şekil 3.2 Thiaklopid (a) İki Boyutlu Açık Formülü ve (b) Top-Çubuk Formülü

3.2.1.3 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (MERCK)

Polar bir çözücü olan DMSO, deltametrin ve thiaklopridin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda kontrol grupları da dozların uygulandığı gruplarda kullanılan konsantrasyondaki DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler uzun süreli saklanacağı zaman, sıvı azot içerisinde dondurularak saklanmaktadır. Sıvı azot, hücreler içerisindeki sıvıların donmasına sebep olduğu için donma noktasını düşürecek soğuktan koruyucu (kryoprotektif) ajanlar eklenmesi gerekmektedir. Çalışmalarımızda DMSO aynı zamanda kryoprotektif ajan olarak kullanılmıştır.

3.2.1.4 Kültür Ortamı

Denelerimizde BEAS-2B hücre hattı kullanılmıştır. Hücreleri büyütmek, çoğaltmak, dondurarak saklamak gibi kültür uygulamalarında ve insektisit uygulamalarında serum içermeyen ve gentamisin ilave edilmiş ticari LHC-8 besi yeri kullanılmıştır (GIBCO). LHC-8 besiyeri (Laboratory of Human Carcinogenesis) LHC basal (serumsuz) besiyeri; 0.08 mM kalsium, 1 mM L-glutamin, oligo elementler, 5 µg/ml insulin, 10 µg/ml transferin, 20 nM hidrokortizon, 5 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 0.5 µM fosfoetanolamin, 0.5 µM etanolamin, 10 nM triiodotayronin, ve sığır hipofiz ekstreği içermektedir. Bu besiyeri içerisine kontaminasyonu engellemek için 50 µg/ml gentamisin eklenmiştir.

3.2.1.5 Attachment (Bağlantı) Faktör (AF) (GIBCO)

Attachment ya da Bağlantı faktörü (AF) kollajen proteini içeren ve hücrelerin kültür kabı içerisinde ince bir tabaka olarak büyümesini sağlayan bir dış matris maddesidir. Aynı zamanda hücre çoğalmasına ve hücrelerin kendilerine özgü olan morfoloji ve fonksiyonlarını korumasına yardımcı olur. Deneilerde hücre büyümesi için kullanılacak olan tüm kaplar deney öncesi AF ile yıkanmıştır.

3.2.1.6 Ultra Saline (LONZA)

Pasajlamaları yapılmadan önce ve besiyeri uzaklaştırıldıktan hemen sonra hücreler yıkama solüsyonu olan ultra salin ile yıkanmıştır. Ultra salin, kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tampon tuzlu suyudur. Hücre yüzeyinden besiyeri içerisinde bulunan bütün kimyasalların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

3.2.1.7 Tripsin-EDTA (LONZA)

Hücre pasajlanması ve insektisit uygulaması sırasında hasatı yapılacak hücrelerin kültür kabından ayrılmalarını sağlamak için, hücreler Tripsin–EDTA ile muamele edilmiştir. Bir serin proteaz enzimi olan tripsin; hücrelerin kültür kabıyla yaptıkları protein bağlarını, lizin ve arjinin aminoasitlerinin olduğu bölgelerden yıkar. Tripsin içerisinde bulunan etilendiamintetraasetik asid [(C₁₀H₁₆N₂O₈) EDTA], hücre kabı içerisinde bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonlarını ortamdan uzaklaştırarak ortamı nötral hale getirir ve tripsinin daha etkili bir şekilde peptid bağlarını yıkmasını sağlar.

3.2.1.8 Tripsin Nötralize Solüsyonu (TNS) (LONZA)

Pasajlama bittiği zaman besiyeri içerisinde tripsinin istenmeyen aktivitesini engellemek için TNS kullanılmaktadır. Bu inhibitör %0.05 serpin (Tripsin inhibitörü) ve %0.1 sığır serum albümünü içerir.

3.2.1.9 Kosmik Kalf Serumı (LONZA)

Uzun süreler saklanacak olan kültürün donma sonrası şoktan korunma ve hayatta kalma şansının artırılmasına yardımcı olmak için kosmik kalf serumu kullanılmıştır. Kosmik kalf serumu, standart kalf serumunun demir ve patentli büyüme hormonu karışımı ile karıştırılması sonucu elde edilmiş yüksek kaliteli bir serumdur. Hücre kültürleri için kullanılan geniş spektrumlu bir serumdur.

3.2.1.10 Sıvı Azot (LN)

Uzun süreli saklanacak hücreler, sıvı azot içinde dondurularak saklanır. Hücreler sıvı azotun buhar fazında donmaya dayanıklı (kriyojenik) tüpler içerisinde kosmik kalf serum ve DMSO karışımında tutulmuştur.

3.2.1.11 Metanol (SIGMA)

Klonojenik testte çoğalan hücre kolonileri boyanmadan önce %75'lik methanol [CH₃OH] kullanılarak hücre kültürü kabında tespit edilmiştir.

3.2.1.12 Kristal Viyole (SIGMA)

Tek hücreden büyüyen kolonilerin sınırlarını tespit etmek için formaldehit içerisinde çözülmüş olan kristal viyole [C₂₅N₃H₃₀Cl] boyası kullanılmıştır.

3.2.1.13 Trypan Mavisi (GIBCO)

Hücre kültürü pasajlarında ve uygulama gruplarının hazırlanmasında hücre sayılarının belirlenmesi ve hücre canlılığının ölçülmesi amacıyla hücreler trypan mavisi [$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$] ile boyanmıştır.

3.2.1.14 Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO)

Hücreler ko-lokalizasyon testinde kullanılmadan önce pH'yı (pH 7.4) ve hücre ozmolaritesini sabit tutmak için, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarını içeren steril PBS tamponuyla yıkanmıştır.

3.2.1.15 Paraformaldehit Solüsyonu (CHEMCRUZ)

Ko-lokalizasyon testinde kullanılan hücrelerin sabitleştirilmesi için paraformaldehit [$OH(CH_2O)_nH$; (n=8-100)] solüsyonu kullanılmıştır.

3.2.1.16 Octylphenol Ethoxylate (Triton X-100) (SIGMA)

Ko-lokalizasyon testinde hücre membranının geçirgenliğini artırmak için triton X-100 [$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$; (n=9-10)] kullanılmıştır.

3.2.1.17 Sodyum Azide (SIGMA)

Ko-lokalizasyon testinde kullanılan hücrelerde olabilecek endositozu engellemek için sodyum azide [NaN_3] kullanılmıştır.

3.2.1.18 Horse Serum (GIBCO)

Ko-lokalizasyon testinde spesifik olmayan antijen-antikor bağlanmasını minimuma indirmek için kullanılmıştır.

3.2.1.19 Bovine Serum Albümin (CHEMCRUZ)

Ko-lokalizasyon testinde spesifik olmayan antijen-antikor bağlanmasını minimuma indirmek için kullanılmıştır.

3.2.1.20 Anti-gamma H2A.X Phospho-Histone (ABCAM)

Ko-lokalizasyon testinde H2AX histon proteinlerinden fosforlanmış olanların belirlenmesi için primer antikor olarak kullanılmıştır.

3.2.1.21 Anti-53BP1 Antibody (CELL SIGNALING)

Ko-lokalizasyon testinde 53BP1 proteinlerine bağlanan primer antikor olarak kullanılmıştır.

3.2.1.22 Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG (ABCAM)

Ko-lokalizasyon testinde H2AX histon proteinlerinden fosforlanmış olanların belirlenmesi için sekonder antikor olarak kullanılmıştır.

3.2.1.23 Alexa Fluor 555 Goat Anti-mouse (ABCAM)

Ko-lokalizasyon testinde 53BP1 proteinlerine bağlanan sekonder antikor olarak kullanılmıştır.

3.2.1.24 Prolong Gold Antifade Reagent - DAPI

Ko-lokalizasyon testlerinde hücre çekirdeklerini boyamak ve floresan boyanın ömrünü uzatmak için de kullanılmıştır.

3.3 Yöntemler

3.3.1 Hücre Kültürü

İlaçlar, endüstriyel kimyasallar, pestisitler, gıda katkı maddeleri gibi kimyasal maddelerin ve diğer çevresel ajanların genotoksik etkilerini araştırmak, insan ve hayvan sağlığının korunması için çok önemlidir. Uluslararası standartlara göre bir kimyasalın genotoksik etkisini araştırmak için, seri deneyler uygulanması gerekmektedir. Bu deneyler önce *in vitro* olarak başlamakta daha sonra *in vivo* testler, *in vitro* testleri izlemektedir (Corvi ve ark., 2013). Amerika Ulusal Kansere Enstitüsü, insan hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha spesifik olduğunu rapor etmiştir (Saygı, 2003). İnsan hücre kültürleri kullanılarak yapılan deneyler sayesinde özellikle pestisitlerin hangi hücre mekanizmayı etkileyerek kansere sebep olduğu spesifik olarak tespit edilebilir. Akciğer kanseri ve pestisitlere maruz kalma arasında kuvvetli bir korelasyon olduğu, çeşitli bilim insanları tarafından rapor edilmiştir (Barthel, 1981; Alavanja, 2004; Guyton ve ark., 2015; Bonner ve ark., 2017). Bu nedenle çalışmamızda American Type Cell Culture'dan (ATCC) temin edilmiş olan BEAS-2B insan bronşiyal epitel hücre hattı kullanılmıştır. BEAS-2B hücreleri, kanser olmayan bir insandan otopsi sonucu alınmış normal akciğer bronşiyal epitel hücreleridir. Yapılan deneylerde bağımsızlığı baskılanmış farelerde tümör oluşmasına neden olmamış, fakat yarı katı besi yerinde koloni oluşturmuştur. BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) hücrelerinin kanserli hücre olmaması özellikle önemlidir. Çünkü araştırmamız normal bronş hücrelerinde görülebilecek genotoksik mekanizmasını açıklamayı hedeflemektedir.

BEAS-2B hücreleri; basal LHC-8 içeren besi yerinde, 37 °C’de, %95 nemde ve %5 CO₂’li inkübatörde tutulmuştur. Besi yerleri kültür bakımı şartlarına uygun olarak haftada iki defa ya da gerekli görüldükçe değiştirilerek hücrelerin gelişimleri izlenmiştir.

3.3.2 Hücre Hattının Çözülmesi

Rutin kültür işlemlerine başlayana kadar BEAS-2B hücreleri, -196 °C sıvı azot bulunan tankta, sıvı azot buhar fazı içerisinde muhafaza edilmiştir. Kültür zamanı geldiğinde sıvı azottan alınan cryovial, su banyosunda hafifçe sallanarak çözülmüş ve hücreler uygun miktarda besiyeri içeren kültür flask içerisine konulmuş ve flask fizyolojik pH’nın sağlanması için 15 dakika süreyle inkübatöre konulmuştur. Bu süre sonunda, serumsuz LHC-8 besiyeri içeren flask içerisine aktarılmış ve %5 CO₂’li inkübatörde, 37 °C’de ve %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir.

3.3.3 Hücre Hattının Pasajlanması

BEAS-2B hücreleri serum bulunan besiyeri içerisinde ve tam konfluent duruma geldiğinde skuamoz epitel hücrelerine farklılaştığı için, serumsuz besi yerinde tutulmuş ve tam konfluent hale gelmeden de pasaj yapılmıştır. Pasaj yapılacak hücrelerin besiyeri vakumla çekildikten sonra, hücreler üzerine tripsin-EDTA eklenmiş ve beş dakika beklenmiştir. Tripsin hücrelerin flask üzerinde bulunan proteinlerle olan bağlantılarını kırarak hücreleri yüzeyden kaldırmaktadır. Bekleme süresi sonrasında, flask içerisine eşit miktarda tripsinin etkisini nötralize eden solüsyon (TNS) eklenmiştir. Seyreltilmiş hücre süspansiyonu, steril falkon tüpüne alınarak santrifüj edilmiş ve sayım için tekrar 1-2 ml solüsyon içerisinde süspansiyon edilmiştir. Hücre süspansiyonununun 10 µl’si eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırılarak sayım lamlarına yüklenmiş ve hücre sayım aletinde mililitre solüsyon içerisindeki hücre sayısı ve canlılık oranı tespit edilmiştir. Sayım sonrası hücre solüsyonu ve besiyeri yapılacak çalışmanın amacına uygun oranda pipetlenerek ekimler yapılmıştır. Yeterli hücre sağlanıncaya kadar bu işleme devam edilmiştir. Her işlemde üretilen bir miktar hücre ise dondurularak saklanmıştır.

3.3.4 Hücre Hattının Dondurulması

In vitro kültür pasajlaması; hücre hatlarında geri dönüşümü olmayan genetik değişikliğe sebep olduğu için, uzun süre pasajlamada kalan hücreler başlangıç

hücrelerinden daha farklı karakterlere sahip olabilir. Bunun engellenmesi ve deneylerin aynı pasaj seviyesinde tekrarının sağlanması için, hücre kültürleri düzenli olarak kısa ve uzun süreli sıvı azotta stoklanmıştır. Stoklanma için, bir milyon hücre 1ml'lik %70 besiyeri, %10 antibiyotik, %10 DMSO ve %10 kozmik kalf serumu karışımı içeren kriyojenik tüpler içerisine konulmuştur. Kriyojenik tüpler; termal şoku engellemek için 8 saat süreyle -80 °C'de tutulmuş, daha sonra sıvı azot tankına -196 °C'ye transfer edilmiştir.

3.3.5 Hücre Sayımı

Hücre kültürüyle çalışırken, hücrelerin besin ortamındaki yoğunluğunu ve canlılığını belirlemek çok önemlidir. Bu nedenle hücre pasajlamaları, hücre stoklarının ayarlanması ve deney setleri hücre süspansiyonları içindeki hücre sayısı ve canlılık oranı belirlendikten sonra tamamlanmıştır.

Hücreler tripan mavisi [$C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$] adı verilen negatif yüklü bir boya ile boyanmıştır. Hücre zarı sağlıklı olan hücrelerde tripan mavisi, hücre içerisine giremez. Cansız olan hücreler, boyayı absorbe ettikleri için, maviye boyanırlar. Hücreler tripan mavisi içerisinde uzun süre bırakılacak olursa canlı hücrelerde boyayı absorbe edeceği için bu testin seri bir şekilde tamamlanması gerekir. Bizim deneylerimizde 10 µl hücre süspansiyonu, 10 µl %0.4'lük tripan mavisiyle karıştırılmış ve bu karışımın 10 µl'si hücre sayım lamına aktararak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda canlı hücre, cansız hücre, toplam hücre ve hücre canlılık oranları belirlenmiştir.

3.3.6 Klonojenik Test

Deltametrin ve thiaklopid etken maddelerinin uygulama dozlarının belirlenmesi için, Wise ve ark., (2004) tarafından geliştirilen klonojenik test uygulanmıştır. Solüsyon hazırlanmasında ticari formülasyona en yakın karışımı oluşturmak için ticari formülasyonlarda bulunan 1:7,5 (Deltametrin + Thiaklopid) molar değişim oranı kullanılmıştır.

Deltametrin ve thiaklopid stokları, %20 DMSO içeren besi yerinde hazırlanmıştır. Tüm uygulamalarda besi yerinde DMSO oranı %2'nin altında tutulmuştur. Uygulama dozları, seyreltme ile mM olarak ayrı ayrı ayarlanmış ve hücreler bu konsantrasyonlarda hazırlanan etken maddeler ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Klonijenik Testte Uygulanan Deltametrin / Thiakloprid Uygulama Dozları

Ticari Formilasyon	Deltametrin (1X)	Thiakloprid (7.5X)
1. DOZ	0.001 mM	0.016 mM
2. DOZ	0.002 mM	0.033 mM
3. DOZ	0.005 mM	0.083 mM
4. DOZ	0.011 mM	0.166 mM
5. DOZ	0.016 mM	0.250 mM
6. DOZ	0.022 mM	0.333 mM
7. DOZ	0.027 mM	0.416 mM
8. DOZ	0.055 mM	0.833 mM
9. DOZ	0.111 mM	1.666 mM
10. DOZ	0.166 mM	2.500 mM

Uygulamalar için altı kuyucuklu kültür kaplarında kuyucuk başına 12.5×10^4 hücre konularak, 24 ve 120 saat süreyle hücreler insektisit karışımına maruz bırakılmıştır. Uygulama süresi sonunda hücreler tripsin ile kuyucuklardan çıkarılmıştır. Hücre süspansiyonu içerisindeki hücre sayısı ve canlılık oranı hesaplanmış ve her bir test grubu için dört ayrı hücre kültürü kabına, yeniden kültür kabı başına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücre kültürü inkübatöre konulmuştur. Her 4-5 günde bir petriyelerdeki besiyeri değiştirilerek, koloni oluşumu gözlenmiş kolonilerin gelişimine göre deney sonlandırılmıştır. Hücre kültürü kabında koloniler yeterli büyüklüğe ulaştığında, besiyeri kültür kabından vakumla çekilmiştir. Daha sonra metanol ile tespit edilen hücreler kristal viyole ile boyanarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonrasında koloniler sayılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar üç deneyin ortalaması kullanılarak değerlendirilmiştir. Doza bağlı hücre sağ kalımı, deney gruplarındaki hayatta kalan hücrelerin yüzdesinin kontrol grubuna göre analiz edilmesi ile hesaplanmıştır.

3.3.7 Deney Planı ve Grupları

Deneylerimizde Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol, İnsektisit Karışım Grubu ve İyileşme grupları (recovery) olmak üzere dört grup kullanılmıştır. Bütün gruplar 24 ve 120 saatlik uygulamalara maruz bırakılmış, iyileştirme grubu uygulama sonrasında taze besiyerine aktarılmıştır. Bu grupların içerikleri, kullanım yöntemleri ve sebepleri aşağıda açıklanmıştır:

3.3.7.1 Negatif (Çözücü) Kontrol Grubu

Negatif Kontrol grubu hiçbir etkinin beklenmediği gruptur. Bu gruptaki hücreler, %2 DMSO içeren besiyeri içerisinde tutulmuştur. DMSO'nun sebep olabileceği etkilerin insektisit karışımının sebep olabileceği etkilerden ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır.

3.3.7.2 Pozitif Kontrol Grubu

Bu grup, özellikle ko-lokalizasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubundaki hücrelerin besiyerlerine, DNA'da kırıklara sebep olan oksitadif stres ajanı hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenmiştir. DNA tamir etkinliğinin araştırıldığı kültürler H₂O₂ muamelesi sonrası, iyileştirme grupları ise 24 saat bekletildikten sonra hasatlanmıştır. Pozitif kontrol grubundaki hücrelerin DNA hasarına nasıl tepki gösterdiklerini gözlemlememize ve uygulama grubu ile karşılaştırmamıza yardımcı olmaktadır.

3.3.7.3 İsektisit Karışım Grupları

Klonojenik test sonuçlarından elde ettiğimiz veriler göz önüne alınarak, üç farklı deltametrin + thiakloprid konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu uygulama gruplarında deltametrin + thiakloprid konsantrasyonları sırasıyla 0.011 + 0.160; 0.022 + 0.333; 0.044 + 0.666 mM dozundadır.

Çizelge 3.2 Deltametrin / Thiakloprid IC₅₀'ye Göre Belirlenen Dozlar

Belirlenen Dozlar	Deltametrin (mM)	Thiakloprid (mM)
1. DOZ	0.011	0.160
2. DOZ	0.022	0.333
3. DOZ	0.044	0.666

İsektisit karışımları, 24 ve 120 saatlik uygulama sürelerinde, farklı zamanlarda MTT ve ko-lokalizasyon testleri için ayrı ayrı uygun kültür kaplarına ilave edilerek inkübe edilmiştir. Muamele süreleri sonrasında kültürlerin hasatları yapılmıştır. Bu grubun amacı, Deltametrin ve thiakloprid karışımının hücrelere olan toksisitesinin belirlenmesidir.

3.3.7.4 İyileşme (Recovery) Grupları

Bu grup, inseksite maruz kalan hücrelerin, insektisit sebep olduğu hasara moleküler seviyede nasıl tepki gösterdiğini anlamak için kullanılmıştır. Deney dozlarının 24 ve

120 saatlik uygulamaları sonrası, insektisit karışımı içeren besiyerleri uzaklaştırılmış, yerine taze besiyeri konulmuştur. Hücreler, 24 saat süreyle inkübatörde taze besiyeri içerisinde tutulmuştur. İyileşme periyodu sonunda hücreler ko-lokalizasyon testine alınmıştır.

3.3.8 MTT Testi

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) bir tetrazolyum tuzudur. Heterosiklik bir yapısı olan organik bir bileşiktir (Altman, 1976). MTT tuzları, elektron alarak indirgendiklerinde formazan denilen bir yapıya dönüşürken; renkleri de sarıdan mora değişmektedir. Tetrazolyum halkasının kırılması ve indirgenmesi, sadece aktif mitokondri tarafından yapılabilmektedir. Bu nedenle bir hücre kültürü, MTT ile muamele edildiğinde renk reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde gözlenir ve ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için herhangi bir renk değişimine uğramazlar (Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004).

Deneylelerimizde hücre canlılığı yüzdesi MTT testi kullanılarak yapılmıştır. PBS tamponu (pH=7) içerisinde %5'lik MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Çözelti ışığa duyarlı olduğu için -4 °C'de karanlıkta saklanmıştır. İnsektisite maruz bırakılan hücrelerin kuyucuklarına 20 µl MTT çözeltisi eklenmiş ve kültür kapları (hücre kültürü) inkübatör içerisinde dört saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında MTT içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar içerisinde oluşan formazon kristallerine, karanlık ortamda, hazırlanan DMSO besiyeri karışımından eklenmiş ve al-ver yapılarak iyice karışması sağlanmıştır. 37 °C'de inkübatörde 15 dakika bekletilmiştir. Oluşan rengin şiddeti 570 nm referans dalga boyu alınarak ölçülmüştür. Absorbans değerlerinin ortalamaları alınmış ve blank (sadece besiyeri absorbans değeri) çıkarılarak değerlerin normalizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 Ko-Lokalizasyon Testi

DNA çift zincir kırıkları, hücreler için en tehlikeli hasarlardan birisidir. Bu hasar tamir edilmezse hücre ölüm tehlikesiyle karşı karşıya kalır. DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan iki protein, γ H2AX (Histon 2A protein ailesinin bir üyesi) ve 53BP1, p53 proteinine bağlanan ve DNA'da çift zincir kırığı olduğunda çekirdekdeki

hasar bölgesine giden proteinlerdir. Hasar bölgesinde γ H2AX ve 53BP1 bir araya gelerek odaklar oluşturmaktadır. Bu iki proteinin DNA çevresinde ko-lokalize olarak oluşturdukları odaklar, floresan boya içeren antikolarla gözlemlenebilir. Xie ve ark., (2005) bu prensibi kullanarak DNA çift kırık hasarlarının tespitini spesifik olarak belirleyebilen γ H2AX ve 53BP1 ko-lokalizasyon testini geliştirmişlerdir.

Satıcı firmanın tavsiyesi göz önüne alınarak γ -H2AX antikoru, 1/500 ve 1/1000 oranlarında seyreltmeler yapılarak deneylerde kullanılmıştır. Ancak bu konsantrasyonlarla hazırlanan prepatlarda arka planda yoğun kırmızı sinyal sebebiyle hücreler ayırt edilememiştir. Bu nedenle seri sulandırma yapılarak daha düşük konsantrasyonlar (1/2000, 1/3000, 1/4000 ve 1/5000) denenmiştir. Denemeler sonucunda en iyi görüntü ve sinyallerin alındığı konsantrasyon, 1/5000 olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonun deneyler için kullanılmasına karar verilmiştir.

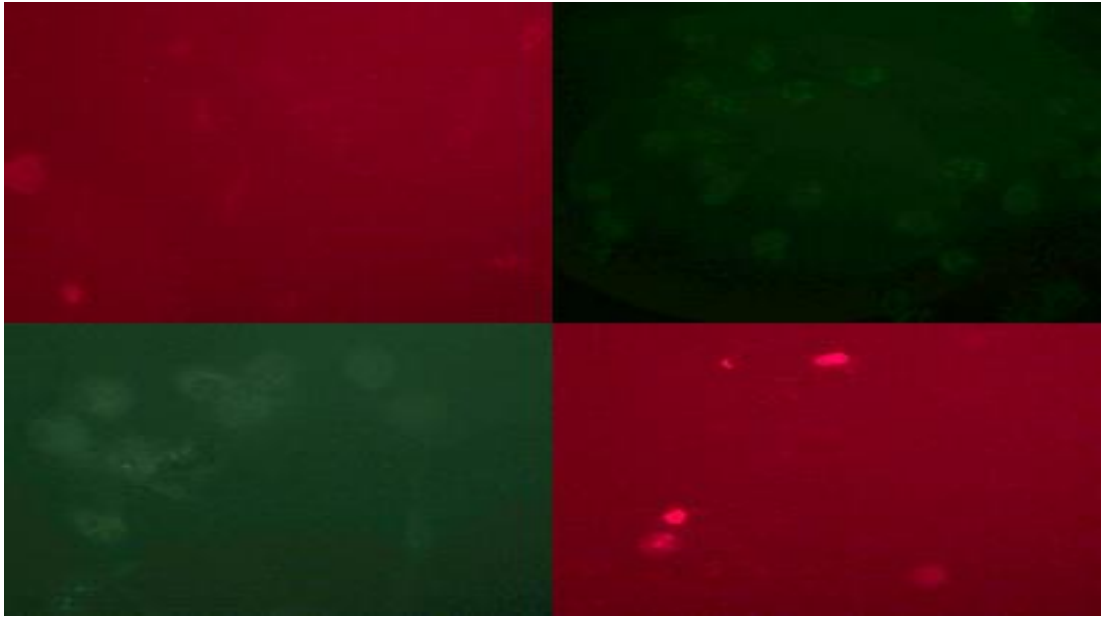
Aynı şekilde yeşil sinyal veren 53BP1 floresans boyaması için kullanılan antikor satıcı firmanın önerdiği şekilde 1/500 oranında kullanılmıştır. Ancak bu sefer çok zayıf sinyaller elde edilmiştir. Bu sebeple bir seri konsantrasyon (1/400, 1/300 ve 1/200) hazırlanmış ve denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonunda 53BP1 için deney konsantrasyonu, 1/250 olarak belirlenmiştir. (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3 Ko-Lokalizasyon Antikor Dozlarının Belirlenmesi

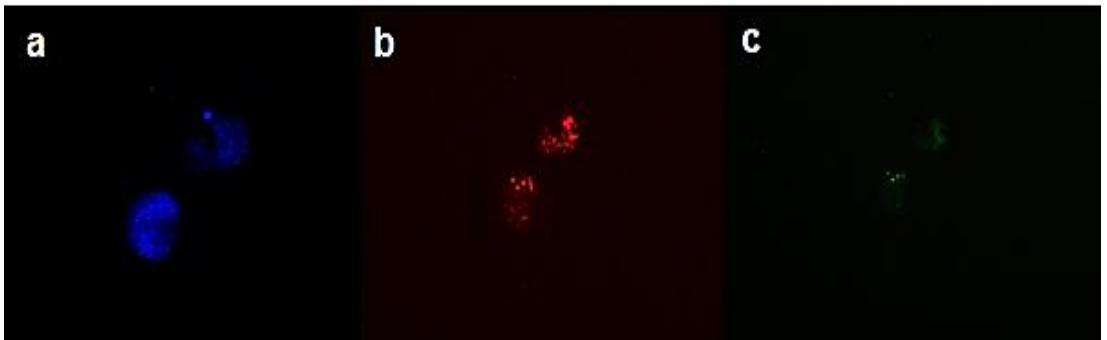
Antikorlar	Önerilen Konsantrasyon	Denene Konsantrasyonlar	Karar Verilen Konsantrasyon
γH2AX	1/500	1/2000	1/5000
		1/3000	
	1/1000	1/4000	
		1/5000	
53BP1	1/500	1/400	1/250
		1/300	
		1/200	

Uygulama çalışmalarında BEAS-2B hücreleri, belirlenen dozlarda insektisit karışımı ile 24 ve 120 saat süreyle muamele edilmiştir. Muamele edilen hücrelerden iyileşme (recovery) grubu, uygulama sonrası 24 saat insektisit içermeyen taze besiyeri aktarılmıştır. Muamelesi tamamlanan hücreler, çekirdekleri uygun floresan ışığa veren sekonder antikolarla muamele edilerek boyanmıştır (Şekil 3.3). Ardından

preparatlar mikroskobik incelemeye alınmıştır. Tüm gruplarda hücre çekirdeklerinin ve ilgili protein odaklarının floresan ışmaları görüntülenmiştir (Şekil 3.4). Odaklar analiz edilirken boyut, yapı ve boya standartları geliştirmiştir. Buna göre boyut açısından çok büyük ve küçük çekirdekler, üst üste gelmiş çekirdekler ve fragment/mikronükleus oluşumları sayılmamıştır. Yapı olarak, düzgün kenarlı ve karakteristik şekilli çekirdekler dahil edilmiştir. Floresans boya için, silik ve boya partikülü olabilecek çok parlak odaklar dikkate alınmamıştır. Standartlara uyan 50 hücre çekirdeği sayılıp, ortalamaları alınarak veriler toplanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3 24 ve 120 Saatlik Antikor Konsantrasyonlarının Optimizasyon Denemeleri Düşük Sinyal (Yeşil) Gösteren ve Yoğun (Kırmızı) Boyanmış Çekirdekler



Şekil 3.4 Deltametrin Thiakloprid Karışımının 120 Saatlik Uygulaması ile Elde Edilmiş BEAS-2B Hücreleri
a) DAPI ile Boyanmış Çekirdekler,
b) Çekirdeklerin γ H2AX Odakları
c) 53BP1 Odakları

3.3.10 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılan tüm veriler  tekrarlı deney ortalamaları alınarak \pm standart hataları ile birlikte verilmiştir. Gruplar arasında farklılıklar Anova tek yönlü varyans analiz metodu ve Tukey testi ile değerlendirilmiş, $p < 0.05$ olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Pestisitler haşerelerin yok edilmesi, azaltılması veya zararlarının engellenmesi için kullanılan kimyasallar ve kimyasal karışımlarıdır. Haşereler, böcekler, kemirgenler, yabancı otlar ya da istenilmeyen diğer organizmalar olabilir (Ecobichon, 2001). Tarım ve besin ürünlerinin haşerelerden korunması ve üretime haşereler tarafından verilen zararın azaltılması dünya nüfusunun beslenebilmesi açısından çok önemlidir. Bu nedenle pestisitler modern çağın en önemli kimyasallarından birisidir. Ancak pestisitlerin haşereler üzerindeki etkisi gittikçe daha sık görülen dirençli türlerin ortaya çıkması nedeniyle azalmaktadır (Hawkins ve ark., 2018; Lemarié ve Marcoul, 2018; Skovmand ve Sanogo, 2018). Pestisitlere karşı oluşan dirençliliği engellemenin etkili yolu dirençliliğin ortaya çıkmasını engellemektir. Bu da uygulama yapılan haşerelerin ilk uygulamada ortadan kaldırılması ile mümkün olur. Etki mekanizmaları farklı olan iki ya da daha çok pestisiti karıştırarak uygulamak pestisit direncinin oluşmasını engelleyen en önemli stratejilerden birisidir. Bu nedenle pestisit karışımları tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hawkins ve ark., 2018; Lemarié ve Marcoul, 2018).

İdeal bir pestisit sadece hedef organizmada olan spesifik bir mekanizmayı etkileyerek sadece hedef organizmaya zarar vermelidir ve hedef olmayan organizmalara zararı minimum derecede olmalıdır. Ancak pestisitlerin büyük çoğunluğu insanlarda dahil olmak üzere hedef olmayan organizmaları da etkilemektedir (Zaller ve Bruhl, 2019).

Hedef olmayan organizmaların pestisitlere maruz kalması genelde çeşitli yollarla olmaktadır. Örneğin su kaynaklarının pestisitlerle kontamine olması, besin zincirindeki biyoakumulasyona, pestisite maruz kalmış tarım ürünlerinin sağlıklı bir şekilde arıtılmadan kullanılması en sıklıkla görülen küçük oranda kontaminasyon sebepleri içerisinde yer almaktadır. Bunların yanı sıra insanlardaki pestisit kontaminasyonu, özellikle meslekleri nedeniyle pestiside maruz kalan kişilerde, nefes yoluyla, deri yoluyla veya ağız yoluyla da yüksek oranda kontaminasyona sebep olmaktadır. Mesleki maruziyeti olan kişiler, pestisit üretim fabrika çalışanları, halk sağlığı çalışanları (pestisit uygulaması yapan işçiler), tarım sektörüdür (özellikle çiftçiler). Bu sektörlerde çalışanlar pestisit uygulaması sırasında uygun koruyucu kıyafet giyinmediyse, uygulama aletleri dikkatlice temizlenmediyse, ya da standartlara uygun

değilse, uygulama sırasında rüzgâr varsa ve pestisit işçinin üzerine sürükleniyorsa yüksek doza hatta letal olabilecek toksik doza maruz kalmak mümkündür (Forkuoh ve ark., 2018; Kalliora ve ark., 2018).

Mesleği nedeniyle pestisitlere maruz kalanlar içerisinde tarım sektöründe çalışanlar bu grubun %75'ini oluşturmaktadır. Maruziyeti en çok deri yoluyla daha sonra nefes yoluyla. Oral maruziyet nadir olarak görülmektedir. Genel bir kural olarak oral yolla alınan pestisitler en toksik, nefes yoluyla alınanlar ikinci derecede toksik ve dermal yolla alınanlar en az toksik etkiyi gösterirler (Damalas ve Koutroubas, 2016). Bu nedenle nefes yoluyla maruziyet en toksik olan sık maruziyet kategorisindedir. Nefes yoluyla alınan maddeler bronşial epitel hücrelerle temasta olmaktadır. Bu nedenlerle bu çalışmada ülkemizde sıklıkla kullanılmakta olan deltametrin ve thiakloprid karışımının BEAS 2B akciğer bronşial hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

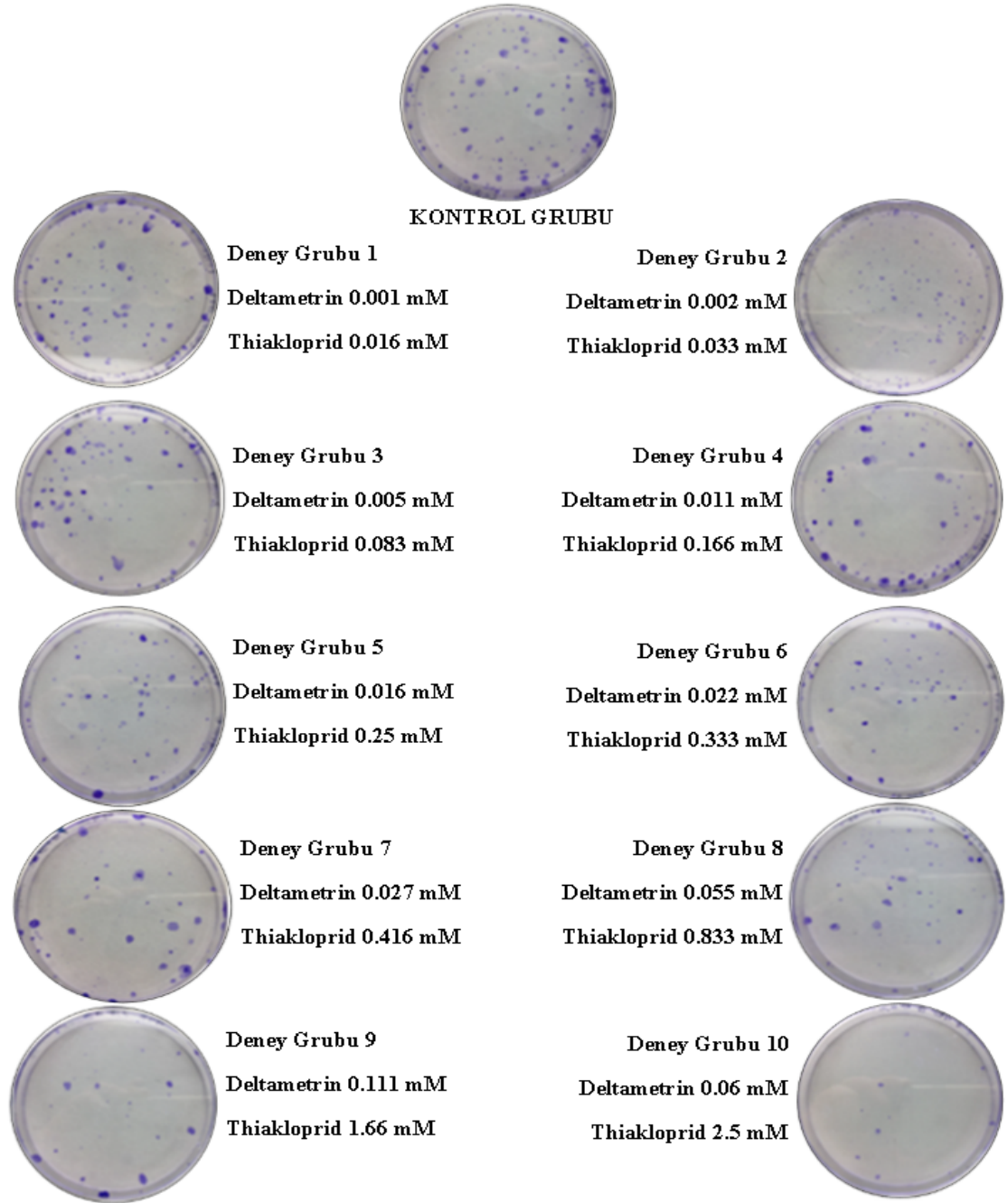
Bu amaçla deltametrin ve thiakloprid etken maddeleri DMSO içerisinde çözülmüş ve daha sonra LHC besi yeri kullanılarak seyreltileri hazırlanmıştır. Bu seyreltiler hazırlanırken deltametrin ve thiakloprid ticari formasyonundaki karışım oranları (1X DEL + 7.5X THI) dikkate alınmış ve stok çözeltiler, mM cinsinden hesaplanarak hazırlanmıştır. Deltametrin ve thiakloprid stokları seyreltme yöntemi ile mM cinsinden ayrı ayrı doz serileri elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

Hazırlanan doz serisi kullanılarak klonojenik testle sitotoksitenin ölçümü için kullanılacak MTT hücre canlılığı testi ve DNA hasarı tespitinde kullanılacak olan kolokalizasyon testinde yer alacak dozlar belirlenmiştir. Bu dozlar Çizelge 3.2'de liste olarak verilmiştir. Bu deneylerden elde edilen veriler grafik ve tablo şeklinde aşağıda sunulmuş ve istatistiksel analizler kullanılarak yapılan değerlendirmelerle birlikte bu veriler yorumlanmıştır.

4.1 Klonojenik Test Sonuçları (IC₅₀'nin ve Deneysel Dozlarının Belirlenmesi)

Deneysel olarak kullanılacak insektisit dozları farklı konsantrasyonlardaki deltametrin (0.001-0.166 mM arasında 10 doz) ve thiakloprid (0.016-2.5 mM arasında 10 doz) karışımlarına 24 ve 120 saat maruz bırakılmış olan BEAS-2B hücrelerinin hücre sağkalım verileri göz önüne alınarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Uygulama gruplarının hücre sağkalım yüzdesi kontrol grubuna göre analiz edilmiştir. İnsektisit konsantrasyonlarının logaritmik ifadesi ve hücre sağkalım yüzdesi kullanarak hazırlanan grafik ile insektisit karışımının IC₅₀ değeri saptanmıştır. İnsektisit karışımının konsantrasyonlarına bağlı hücre sağkalım verileri (Çizelge 4.1), deney gruplarındaki canlı hücre sayısının, kontrol grubuna oranı analiz edilerek belirlenmiştir.



Şekil 4.1 İnsektisit Karışımı ile 120 Saat Muamele Edilen BEAS-2B Hücreleri ile Yapılan Klonojenik Test

Deneylet üç kez tekrarlanmış ve üç deneyin ortalamaları alınmıştır. İnsektisit karışım konsantrasyonlarının 24 ve 120 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen hücre sağkalım değerleri ve IC₅₀ değerinin hesaplanması amacıyla konsantrasyonların logaritmik ifadesi Çizelge 4.1’de, klonojenik testin koloni oluşum resimleri Şekil 4.1 ve sonuçları Şekil 4.2 ve 4.3’teki grafiklerde gösterilmiştir.

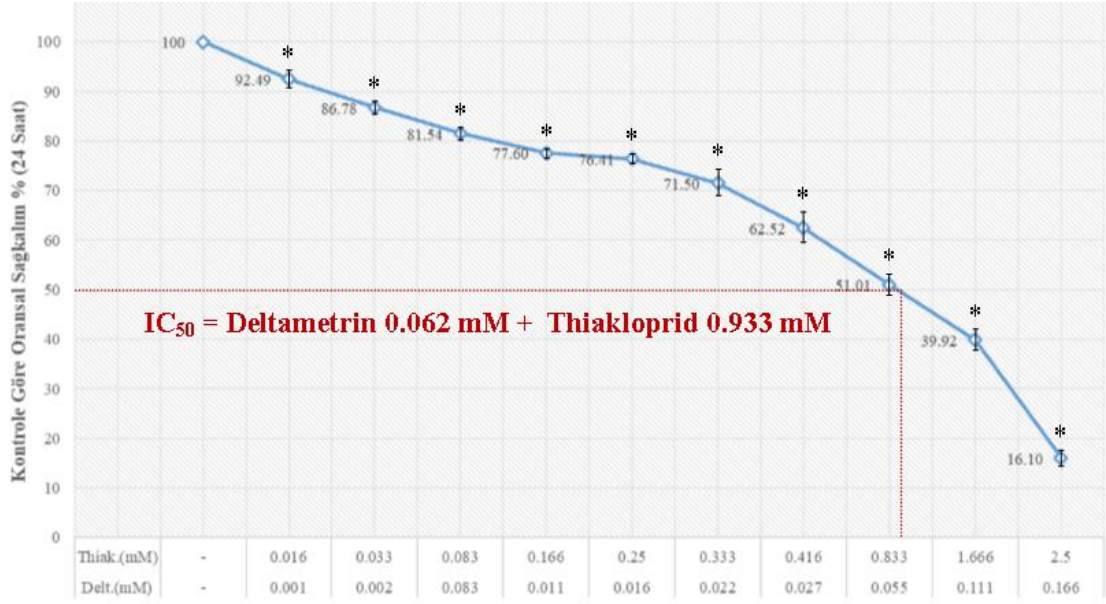
BEAS-2B hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri ve insektisit konsantrasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Agarda oluşan koloni sayısı insektisit konsantrasyonu arttıkça azalmıştır.

Çizelge 4.1 24 ve 120 Saatlik Klonojenik Test Sonuçları

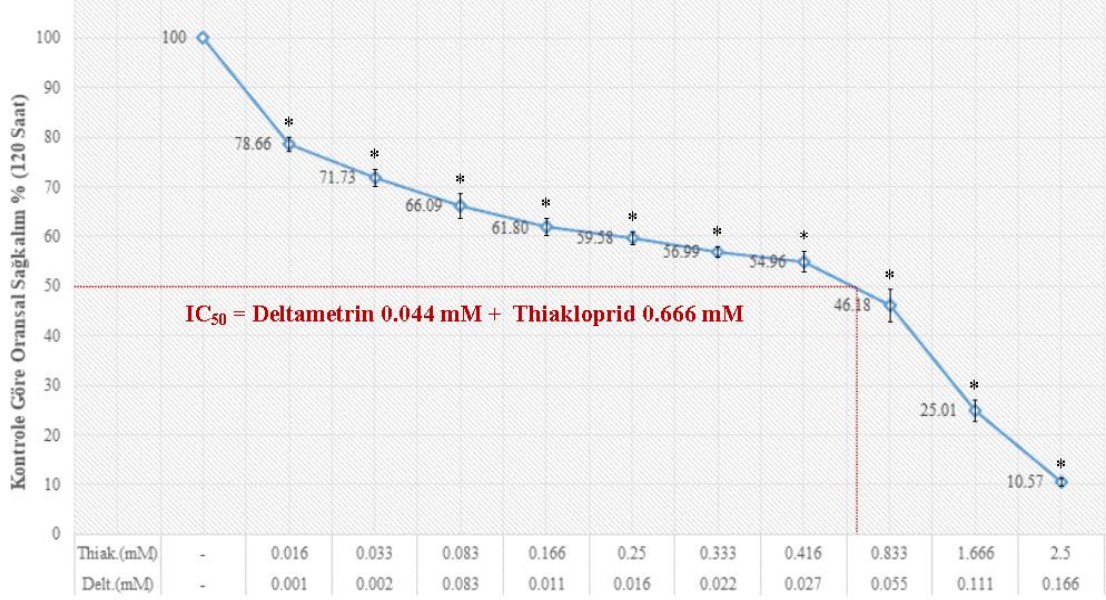
Konsantrasyonlar (mM)		24 saatlik maruziyetleri sonucu		120 saatlik maruziyetleri sonucu	
DELT	THI	Konsantrasyon (Log)	Hücre Sağkalımı (%) ± SE	Konsantrasyon (Log)	Hücre Sağkalımı (%) ± SE
-	-	0.00	100.00	0.00	100.00
0.001	0.016	-0.28	92.49±3.26	-0.28	78.66±3.26
0.002	0.033	0.03	86.78±1.86	0.03	71.73±4.09
0.005	0.083	0.42	81.54±2.06	0.42	66.09±6.06
0.011	0.166	0.73	77.60±1.30	0.73	61.8±3.82
0.016	0.250	0.90	76.41±1.01	0.90	59.58±2.64
0.022	0.333	1.03	71.50±6.17	1.03	56.99±1.62
0.027	0.416	1.12	62.52±6.69	1.12	54.96±5.00
0.055	0.833	1.43	51.01±4.39	1.43	46.18±8.52
0.111	1.666	1.73	39.92±3.70	1.73	25.01±5.19
0.166	2.500	1.90	16.10±2.86	1.90	10.57±1.17

Deltametrin ve thiakloprid karışımının toksik etkilerini ve bu karışıma maruz kalan hücrelerin sağkalım potansiyellerinin belirlenmesi için, BEAS-2B hücreleri etken maddelerden hazırlanan farklı konsantrasyondaki insektisit karışımına 24 ve 120 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrası petri kabı içinde agar üzerine hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler belirli bir büyüklüğe gelince yapılan koloni sayımı uygulama süreci ve doz arttıkça koloni oluşumunun azaldığını göstermiştir. Sayısal değerler kullanılarak, zamana göre koloni oluşumundaki azalmaya bağlı olarak hayatta kalan hücre miktarındaki değişim, hücre canlılığı olarak ölçülmüştür. Bu değerler daha sonra

koloni sayılarını yarıya indiren IC₅₀ değerinin tespit edilmesinde kullanılmıştır (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2 24 Saatlik Uygulama Sonrası İnektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Hücre Sağkalımının Değişimi
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)



Şekil 4.3 120 Saatlik Uygulama Sonrası İnektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Göre % Hücre Sağkalımının Değişimi
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)

Klonojenik test sonuçları 24 saatlik uygulamada hücre sağkalım yüzdesini hem düşük dozlarda, örneğin 0.011 mM DEL + 0.166 mM THI, hem ara dozlarda hem de yüksek dozlarda, örneğin 0.055 mM DEL + 0.833 mM THI insektisit uygulamasının hücre canlılığını önemli ($p < 0.05$) derecede düşürdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.2). Ayrıca insektisit karışımının hücre sağkalımına etkisinin doza bağlı olduğu verilerimizde de görülmüştür. Doz arttıkça hücre sağkalım yüzdesi düzenli olarak azalmaktadır. 120 saatlik uygulama da benzer sonuçlar göstermiştir. Hücre canlılığı düşük dozlarda azalmıştır ($p < 0.05$). Hücreler yüksek dozda insektisit karışımıyla muamele edildiğinde, hücre canlılığının hem kontrole hem de düşük dozlardaki insektisit uygulamasına göre çok daha azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.005$) (Şekil 4.3). Örneğin, 24 saatlik uygulamada 0.055 mM DEL + 0.833 mM THI, 120 saatlik uygulamada ise 0.027 mM DEL + 0.416 mM THI uygulamasından başlayarak artan dozlarda hücre canlılığı dramatik bir şekilde azalmıştır. Kontrole göre canlılığı %50 düşüren dozların logaritmik hesaplama ile 24 saatte 0.062 mM DEL + 0.933 mM THI ve 120 saatte 0.044 mM DEL + 0.666 mM THI olduğu tespit edilmiştir. Hücre kültüründe yapılan deneylerde doz belirlemesi ve IC_{50} saptanması çalışmalarında akut toksisite değerleri 24 saatlik uygulama sonrası, kronik toksisite değerleri ise 120 saatlik uygulama sonrasında tespit edilmektedir. Verilerimiz kullanılarak IC_{50} değeri hem akut hem de kronik olarak hesaplanmıştır. Ancak MTT testlerinde ve DNA kırık tespiti deneylerinde kronik etki göz önüne alındığı için, 120 saatlik test süresi kullanılarak hesaplanan kronik IC_{50} değeri olan 0.044 mM DEL + 0.666 mM THI deney dozlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bu değerler göz önüne alındığında 0.044 mM DEL + 0.666 mM THI konsantrasyonu, MTT testi ve DNA hasarının ölçüleceği ko-lokalizasyon testleri için en yüksek doz olarak belirlenmiştir. Bulgularda bu doz, yüksek doz olarak anılacaktır. Yüksek doza ek olarak ayrıca, bir ara ve bir düşük iki doz daha kullanılmıştır. Düşük doz 0.011 mM DEL + 0.166 mM THI olarak belirlenmiştir ve bulgularımızda düşük doz olarak anılacaktır. Ara doz ise 0.022 mM DEL + 0.333 mM THI olarak bulunmuştur ve bulgular bölümünde ara doz olarak anılacaktır.

4.2 MTT Testi Sonuçları

Klonojenik çalışmalarda tespit edilen hücre sağkalımı dozlarını doğrulamak amacıyla, MTT testi kullanılarak hücre canlılığı belirlenen dozlarda tekrar teyit edilmiştir. MTT testinde sitotoksosite uygulama süresi sonrası, kuyucuklarda bulunan canlı hücrelerin oranı belirlenmektedir. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarına besiyeri içerisinde 5×10^4 insan BEAS-2B hücresi olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	1. Doz	1. Doz	1. Doz	2. Doz	2. Doz	2. Doz
B	3. Doz	3. Doz	3. Doz	4. Doz	4. Doz	4. Doz	5. Doz	5. Doz	5. Doz	6. Doz	6. Doz	6. Doz
C	7. Doz	7. Doz	7. Doz	8. Doz	8. Doz	8. Doz	9. Doz	9. Doz	9. Doz	10. Doz	10. Doz	10. Doz
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 4.4 96 Kuyucuklu Kültür Kaplarında Yapılan Uygulama Planı

Hücreler kuyucuklara üç tekrarlı olarak ekilmiştir. Ekimden sekiz saat sonra protokol doğrultusunda hazırlanan deltametrin ve thiakloprid doz karışımları kuyucuklar içerisine eklenmiştir. Hücreler insektisit karışımları içerisinde 24 ve 120 saatlik süreyle 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Sürelerin sonunda, MTT protokolü uyarınca işlemler gerçekleştirilmiş ve mikropilaka okuyucu ile 570 nm'de absorbanları okunmuştur. Okunan absorban değerlerinin ortalamaları alınarak, bunlardan blank değeri (sadece besiyerinin absorban değeri) çıkarılıp normalizasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3).

Deneyle üç kez tekrarlanmış, her tekrarda blank, negatif kontrol ve dozlar kullanılarak ölçümler alınmıştır. Her iki zaman diliminde alınan sonuçların ortalamaları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 24 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm ± SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
-	-	0.740±0.10	0.642
0.001	0.016	0.653±0.09	0.555
0.002	0.033	0.830±0.05	0.732
0.005	0.083	0.681±0.01	0.583
0.011	0.166	0.514±0.04	0.416
0.016	0.250	0.485±0.06	0.387
0.022	0.333	0.513±0.11	0.415
0.027	0.416	0.471±0.04	0.373
0.055	0.833	0.420±0.06	0.322
0.111	1.666	0.286±0.01	0.188
0.166	2.500	0.382±0.03	0.284
Blank		0.098±0.02	0.000

Çizelge 4.3 120 Saat Uygulamada İnsektisit Karışımının Dozlarına göre Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm ± SE	Veri doğrulama (Veri-Blank)=Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
-	-	0.481±0.03	0.400
0.001	0.016	0.623±0.02	0.542
0.002	0.033	0.574±0.01	0.493
0.005	0.083	0.515±0.08	0.434
0.011	0.166	0.397±0.02	0.316
0.016	0.250	0.434±0.02	0.353
0.022	0.333	0.439±0.02	0.358
0.027	0.416	0.359±0.05	0.278
0.055	0.833	0.207±0.03	0.126
0.111	1.666	0.120±0.02	0.039
0.166	2.500	0.137±0.01	0.056
Blank		0.081±0.02	0.000

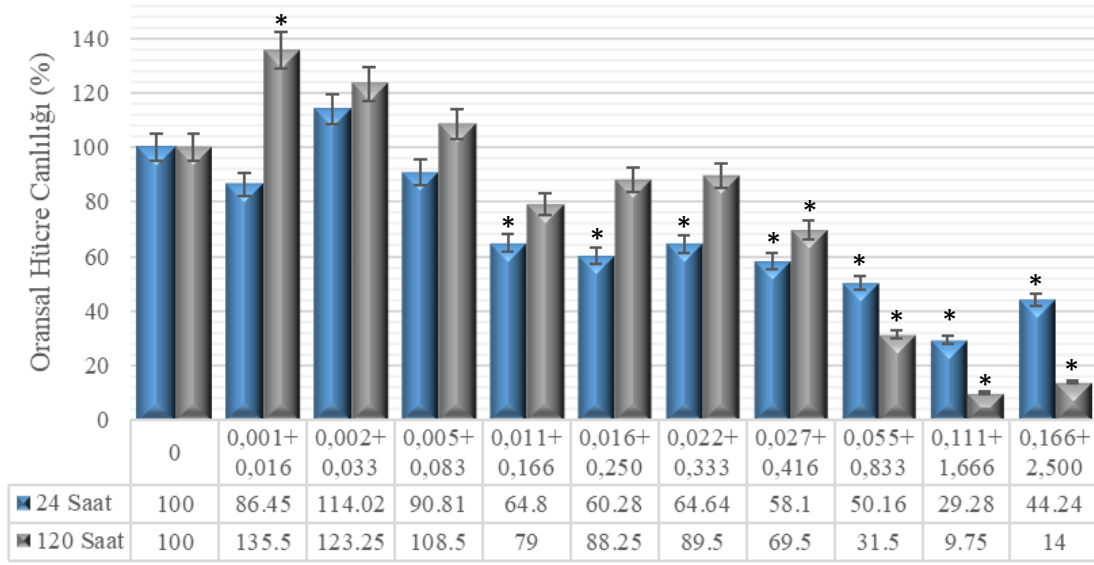
24 ve 120 saatlik uygulama süresi için hücre canlılığı ve sitotoksosite aşağıdaki formül ile hesaplanarak belirlenmiş (Çizelge 4.4)

$$\text{Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Ortalama Doğrulanmış İlaçlı Kuyucuğun Absorbans Değeri}}{\text{Ortalama Doğrulanmış Kontrol Kuyucuğun Absorbans Değeri}} \times 100$$

Çizelge 4.4 İnsektisit Karışımına Ait Konsantrasyonların 24 ve 120 Saat Uygulamaya ait Hücre Canlılığı Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		24 saat	120 saat
Deltametrin	Thiakloprid	Hücre canlılığı (%)	Hücre canlılığı (%)
-	-	100	100
0.001	0.016	86.45	135.50
0.002	0.033	114.02	123.25
0.005	0.083	90.81	108.50
0.011	0.166	64.80	79.00
0.016	0.250	60.28	88.25
0.022	0.333	64.64	89.50
0.027	0.416	58.10	69.50
0.055	0.833	50.16	31.50
0.111	1.666	29.28	9.75
0.166	2.500	44.24	14.00

24 ve 120 saat uygulama süresine göre hesaplanan hücre canlılıkları, ortak bir grafikte ele alınarak karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 4.5). Ayrıca sitotoksosite değerleri için, her iki uygulama süresi tek bir grafikte ifade edilmiştir (Şekil 4.6).

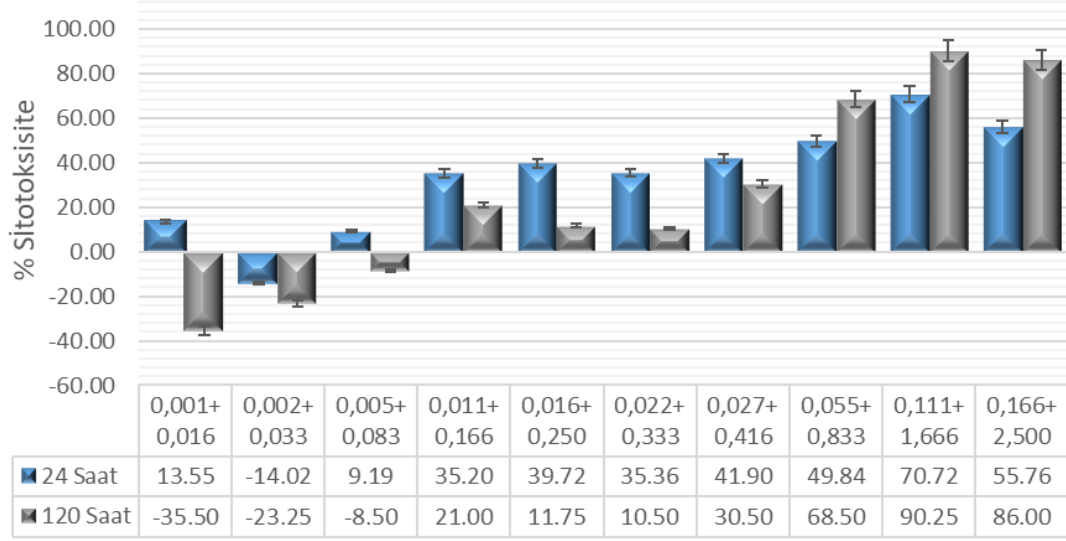


Deltamethrin ve Thiachloprid Karışımları

Şekil 4.5 24 ve 120 Saat Uygulamalarında Kontrolde Göre Hücre Canlılığının (%) İnsektisit Karışımının Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Aynı klonojenik testte görüldüğü gibi, hazırlanan deltametrin ve thiachloprid karışımlarının tüm dozlarına uygulanan MTT testinde, 24 ve 120 saatte düşük ve ara dozlarda zayıf bir sitotoksosite, yüksek dozlarda ise yüksek bir sitotoksosite olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Klonojenik testten elde edilen deltametrin ve thiachloprid dozlarının hücre canlılığına olan etkisi ile MTT test sonuçlarından elde edilen hücre canlılığı sonuçlarının karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırma, klonojenik testten elde edilen koloni oluşum değerlerinin gösterdiği doz-cevap eşleşmeleriyle birebir örtüşmediğini göstermiştir. Buna karşın MTT testlerinin kendi içindeki zamana ve doza bağlı sitotoksosite değişiminin, klonojenik testin doz ve zamana bağlı toksik etki bulgusuyla uyumlu olduğu gözlenmiştir.



Deltametrin ve Thiakloprid Karışımları

Şekil 4.6 24 ve 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksosite Değerleri

4.3 Klonojenik Test Sonucu Belirlenen Deney Dozları ile Yapılan MTT Test Sonuçları

Klonojenik analiz sonuçları ile belirlenen üç doz kullanılarak, 24 saat (Çizelge 4.5) ve 120 saat süreyle insektisit karışımına maruz bırakılan hücrelerde, insektisit karışımının sitotoksik etkisi tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). MTT testi uygulamaları sonucu elde edilen absorbans değerlerinin normalizasyon işlemleri sonrasında hücre canlılıkları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.5 24 Saat Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm ± SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
-	-	0.546±0.04	0.469
0.011	0.166	0.387±0.04	0.310
0.022	0.333	0.344±0.02	0.267
0.044	0.666	0.312±0.04	0.235
Blank		0.077±0.04	0.000

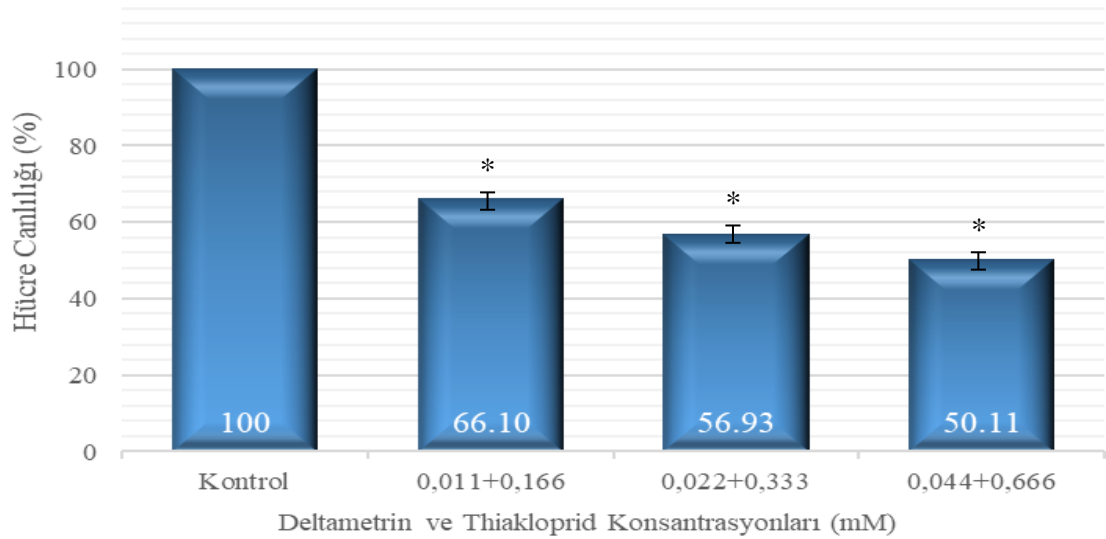
Çizelge 4.6 120 Saat Uygulama Sonrası Hesaplanan Normalizasyon Değerleri

Konsantrasyonlar (mM)		OD 570 nm ± SE	Veri doğrulama (Veri-Blank) = Normalizasyon
Deltametrin	Thiakloprid		
-	-	0.644±0.03	0.585
0.011	0.166	0.313±0.11	0.254
0.022	0.333	0.296±0.07	0.237
0.044	0.666	0.180±0.05	0.121
Blank		0.059±0.02	0.000

Çizelge 4.7 24 ve 120 Saatlik Uygulamalardaki Hücre Canlılığı Değerleri

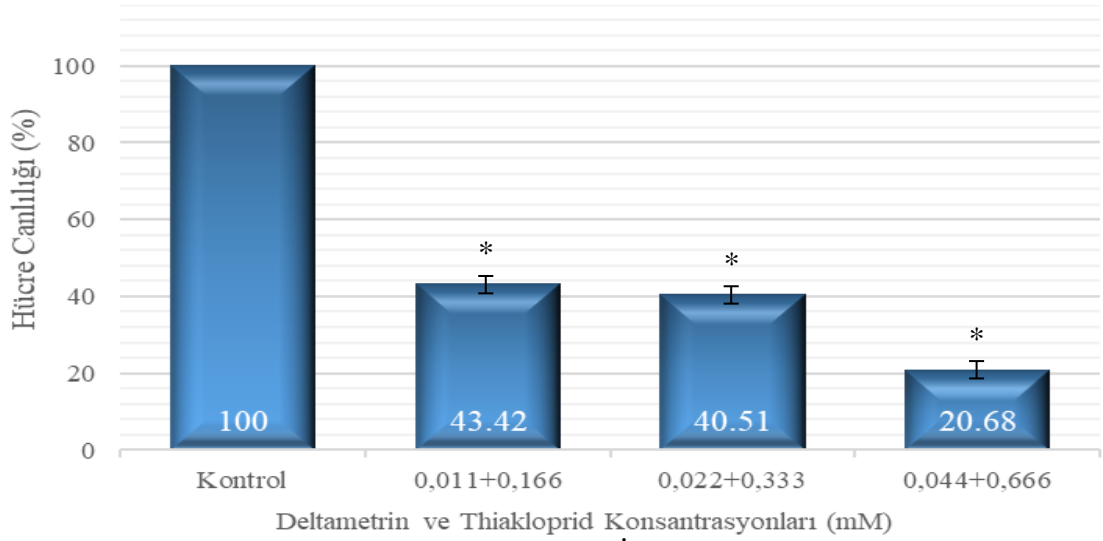
Konsantrasyonlar (mM)		Hücre Canlılığı (%)	
Deltametrin	Thiakloprid	24 saat	120 saat
0.011	0.166	66.10	43.42
0.022	0.333	56.93	40.51
0.044	0.666	50.11	20.68

Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7’de belirtilen veriler kullanılarak, deltametrin ve thiakloprid karışımlarının hücre canlılıklarına etkileri, 24 ve 120 saatlik uygulamalar için ayrı ayrı grafiklenmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7 Kontrole Göre Hücre Canlılığının İnsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi (24 Saat)

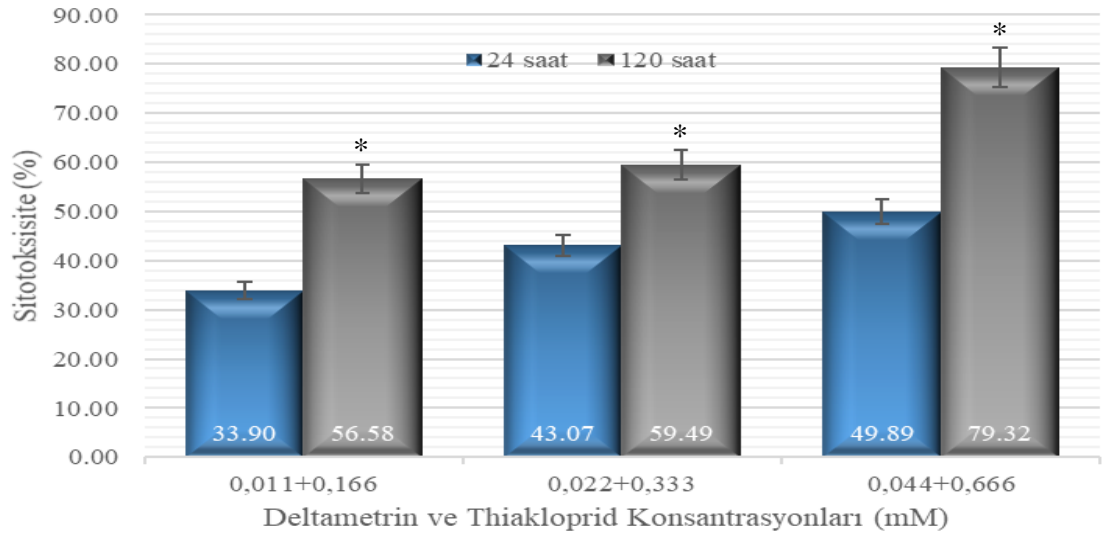
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder (p<0.05)



Şekil 4.8 Kontrole Göre Hücre Canlılığının İsektisit Konsantrasyonlarına Bağlı Değişimi (120 Saat)

[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)

Hücre canlılığı verilerine göre, deltametrin ve thiakloprid karışımlarının 24 ve 120 saatlik sitotoksik etkileri ise tek bir grafik halinde Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 24 ve 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilen Ortalama Hücre Canlılığı Verilerinden Hesaplanan Sitotoksiste Değerleri

[*] $p<0.05$ aynı dozlarda zamana bağlı farklılıkların önemini ifade eder

Klonojenik test sonuçlarından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda belirlediğimiz üç dozla (deltametrin ve thiakloprid karışımı) yapılan MTT test çalışmaları (Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7), insektisit karışımının akciğer bronşiyal epitel hücrelerine (BEAS-2B) hem akut hem de kronik muamele (24 ve 120 saat) sonrasında sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir.

MTT testinin 24 saat sonuçlarına göre, uygulanan üç dozun da hücre canlılığını kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda ($p < 0.05$) önemli derecede düşürdüğü gözlenmiştir. İstatistiksel analizde hücre canlılığında gözlenen bu doza bağlı azalış 24 saatlik uygulama grupları arasında anlamlı bulunmasa da yüksek doz grubunda (0.044 mM DEL + 0.666 mM THI) gözlenen sitotoksosite hem ara, hem de düşük dozdan (0.001 mM DEL + 0.016 mM THI ve 0.022 mM DEL + 0.333 mM THI) daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).

MTT testinin 120 saat sonuçlarında ise ara doz ve düşük doz grubu (0.001 mM DEL + 0.016 mM THI ve 0.022 mM DEL + 0.333 mM THI) birbirine yakın sitotoksositeye sahip olduğu, düşük ve ara dozula, yüksek doz arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Yüksek doz grubunda (0.044 mM DEL + 0.666 mM THI) hücre canlılığı diğer gruplarla karşılaştırıldığında hem kontrol grubundan hem de her iki uygulama grubundan (düşük doza ve ara doz) istatistiksel olarak önemli derecede düşmüş olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).

Deltametrin ve thiaklopid karışımının BEAS-2B hücrelerinde hücre canlılığını etkilediği açıkça görülmektedir ($p < 0.05$). En yüksek dozda (0.044 mM DEL + 0.666 mM THI); düşük dozlara göre hücre canlılığını daha fazla düşürdüğü, 120 saatlik uygulamada 24 saate göre hücre canlılığını aynı şekilde daha fazla düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

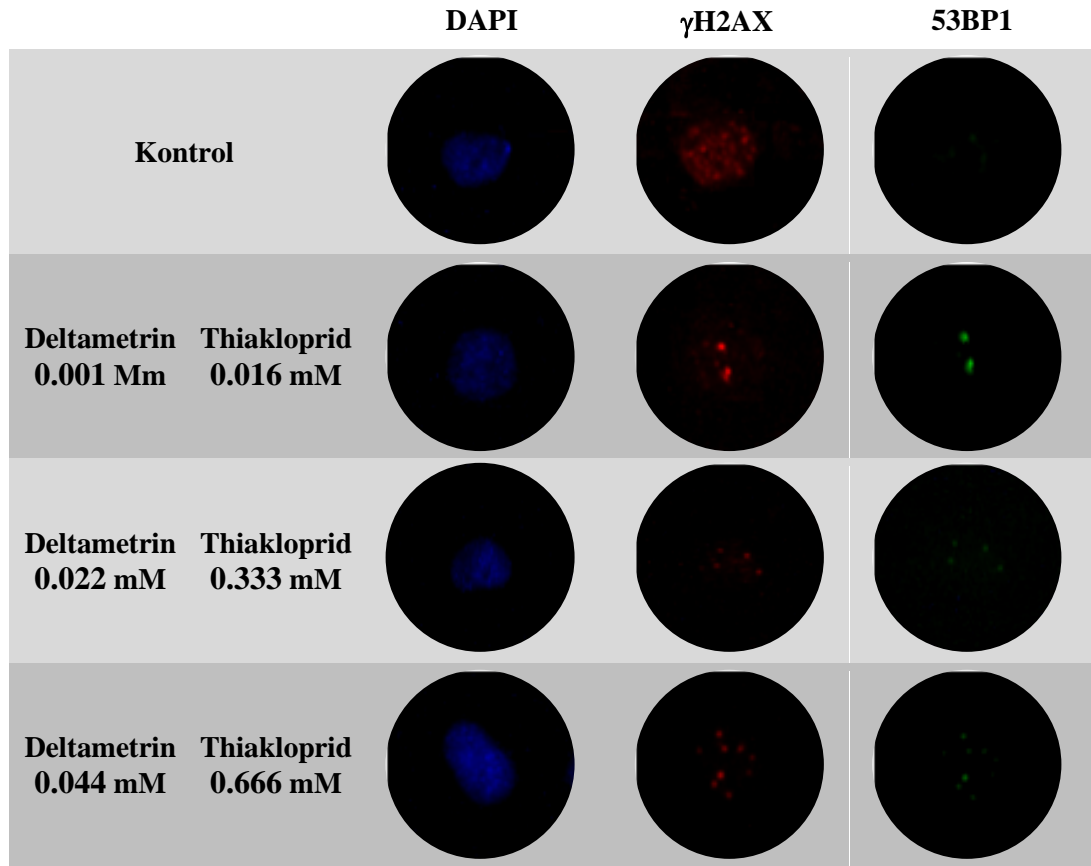
Deltametrin ve thiaklopid karışımının sitotoksik etkisi, BEAS-2B hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 4.9). Her iki deney süresinde doz grupları arasında istatistiksel analiz sonucu ($p < 0.05$) önemli farklar tespit edilmiş ve insektisit karışımının doza bağlı olarak sitotoksiteyi görünür bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. 24 ve 120 saat uygulamaları göz önüne alındığında söz konusu sitotoksosite seviyelerindeki zamana bağlı artışın istatistiksel olarak da ($p < 0.05$) önemli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, söz konusu deney koşullarında test edilen insektisit karışımının BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.

4.4 Ko-Lokalizasyon Testi Sonuçları (DNA Hasar ve Tamirinin Belirlenmesi)

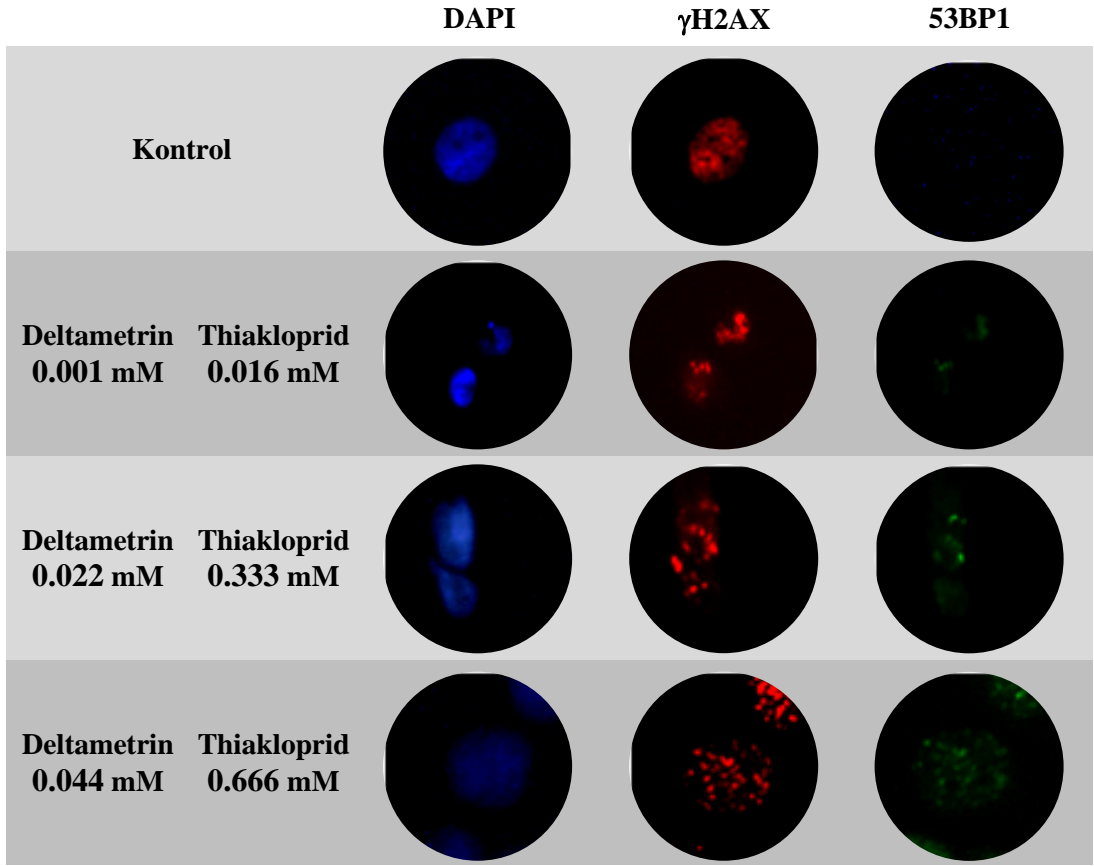
γ H2AX ve 53BP1 proteinleri, DNA çift zincir kırıklarının tamirinde görev alan iki proteindir. Her iki protein de p53 proteinine bağlanır ve DNA'da çift zincir kırığı

olduğunda çekirdekteki hasar bölgesine p53 ile ko-lokalle olurlar. Hasar bölgesinde γ H2AX ve 53BP1 proteinleri bir araya gelerek odaklar oluşturmaktadır. Bu iki proteinin DNA çevresinde yerleşerek oluşturdukları odakların floresan boya içeren antikorlarla gözlemlenmesi, ko-lokalizasyon çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

Ko-lokalizasyon testi, deltametrin ve thiakloprid karışımlarına maruz bırakılmış BEAS-2B hücrelerine uygulanmıştır. Hücreler klonojenik test sonuçlarından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda tespit edilen üç doza 24 ve 120 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücreler hasat edilerek floresan boya içeren antikorlarla boyanmış ve preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar floresan filtreli ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Hazırlanan preparatlar ko-lokalizasyon testi yönteminde belirtildiği gibi boyanarak, hücre çekirdeklerinde gözlenen γ H2AX ve 53BP1 odak oluşumları sayılmıştır (Şekil 4.10 ve 4.11).



Şekil 4.10 24 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilmiş BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Doza Bağlı ve Kontrolle Göre Değişim Örnekleri



Şekil 4.11 120 Saatlik Uygulama Sonrası Elde Edilmiş BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Doza Bağlı ve Kontrole Göre Değişim Örnekleri

Sayımlara başlanmadan önce çekirdek morfolojisi ve odak kaliteleri açısından ortak standart bir eşik belirlenmiştir. Bu eşik doğrultusunda sayımlar yapılmıştır. Hücre başına düşen odak sayıları, en az 50 hücre çekirdeğinde sayım yapıldıktan sonra deney tekrarlarının ortalamaları alınarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda zamana ve doza bağlı odak sayısı değişikliği tespit edilmiştir. Şekil 4.10 ve 4.11’de görülen fotoğraflar farklı doz ve zaman noktalarında gözlemlenmiş olan hücre çekirdeklerini temsil eden örneklerdir.

Uygulama dozlarına ve zamana bağlı olarak elde edilen ortalama odak sayıları, γ H2AX ve 53BP1 kendi aralarında ve her ikisi birlikte (ko-lokalizasyon) olacak şekilde değerlendirilerek kaydedilmiştir. Bu testler üç kez tekrarlanmış ve verilerin ortalaması alınmıştır (Çizelge 4.8). Elde edilen sonuçlar 24 ve 120 saatlik süreçlerde doza bağlı değişimler şeklinde grafiklendirilmiş (Şekil 4.12 ve 4.13) ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

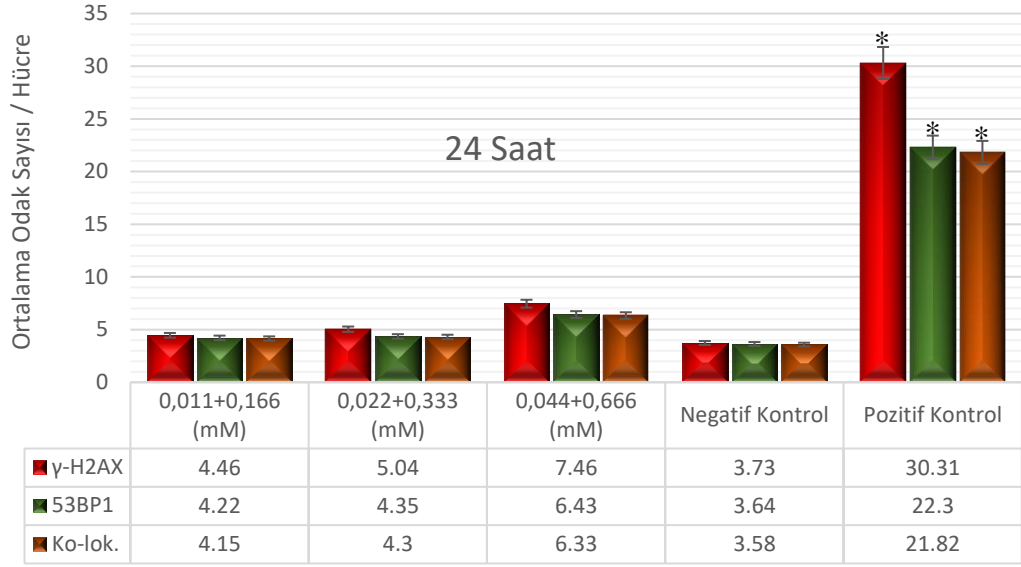
Çizelge 4.8 24 ve 120 Saatlik Uygulaması Sonrası Doza Bağlı Olarak Hücre Başına Sayılan Ortalama Odak Sayıları (3 deney tekrarından elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır)

Konsantrasyonlar (mM)		24 saat			120 saat		
DEL	THI	γ -H2AX	53BP1	Ko-lok.	γ -H2AX	53BP1	Ko-lok.
0.001	0.016	4.46±1.49	4.22±0.29	4.15±0.30	8.17±0.68	7.70±0.78	7.60±0.83
0.022	0.333	5.04±0.61	4.35±0.78	4.30±0.73	9.15±1.28	8.83±1.73	8.83±1.73
0.044	0.666	7.46±1.11	6.43±0.99	6.33±0.96	14.78±3.61	14.06±1.13	13.81±0.86
Negatif Kontrol		3.73±0.52	3.73±0.52	3.64±0.40	3.58±0.92	4.05±0.65	3.78±0.76
Pozitif Kontrol (H₂O₂)		30.31±2.61	30.31±2.61	22.30±2.95	21.82±2.47	31.68±4.79	26.24±4.92

İnsektisit karışımına 24 ve 120 saat süreyle maruz bırakılan hücrelerde gözlenen ortalama odak sayıları çözücü kontrol ve pozitif kontrol grupları ile ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. 24 saat sonunda düşük (0.001 mM deltametrin + 0.016 mM thiakloprid) ve ara dozda (0.022 mM DEL + 0.333 mM THI) elde edilen odak sayıları, çözücü kontrolle karşılaştırıldığında tüm dozlarda tüm odaklar için zayıf bir artış görülse de istatistiksel öneme ($p>0.05$) sahip bir fark tespit edilmemiştir.

Yüksek dozda (0.044 mM DEL + 0.666 mM THI) ise kendi içinde, kontrole göre γ -H2AX odak sayıları ($p<0.05$) 53BP1 ve ko-lokalizasyon ($p<0.05$) odaklarından daha önemli farklılığa sahip olup, her iki tip protein ve ortak lokalize odaklarının sayıları, kontrolden önemli derecede farklı bulunmuştur ($p<0.05$).

Uygulanan doz gruplarında çözücü kontrole göre tespit edilen farklar, pozitif kontrolle karşılaştırıldığında aralarında belirlenen istatistiksel olarak büyük farklılık ($p<0.05$) deltametrin ve thiakloprid karışımlarının söz konusu deney süresinde, pozitif kontrol kadar etkili olmadığını ($p>0.05$) işaret etmektedir (Çizelge 4.8, Şekil 4.12).

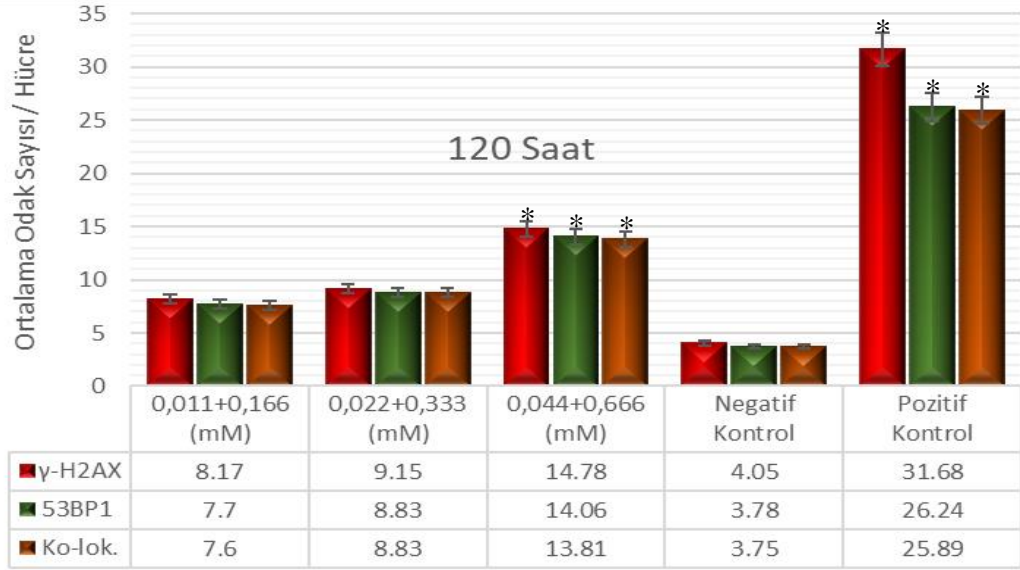


Şekil 4.12 24 Saatlik Uygulaması Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p<0.05$)

Deltametrin ve thiakloprid karışımının BEAS-2B hücrelerine 120 saatlik uygulaması sonucu; DNA çift zincir kırık belirteci γ -H2AX ve DNA onarım proteinlerinin hasar bölgesine toplanmasını sağlayan 53BP1 protein odaklarının, öncelikle 24 saate göre tüm uygulama dozlarında arttığı görülmektedir. Bu artışlar, düşük doz hariç çözücü kontrole karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

0.022 mM DEL + 0.333 mM THI karışım dozunda odak oluşum sayıları istatistiksel olarak incelendiğinde, γ -H2AX ve birlikte lokalize oldukları odaklar ($p<0.05$) ve 53BP1 odak miktarı ($p<0.05$) kontrole göre önemli derecede artış göstermiştir. 24 saat uygulamasında olduğu gibi deneyin bu zaman noktasında da yüksek dozda meydana gelen odak oluşumlarının miktarı, çözücü kontrolden oldukça farklı elde edilmiş ve bu farklar istatistiksel anlamda ($p<0.05$) önemli bulunmuştur.

Bu uygulamada yüksek dozdaki γ -H2AX odakları ile 53BP1 odakları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli derecede olmasa da diğer dozlarda ve 24 saatlik uygulamada gözlenen şablondan farklı, pozitif kontroldekine de benzer olması dikkat çekmektedir. 24 saatlik uygulamada olduğu gibi pozitif kontrole tüm dozlar arasındaki farkların, istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8, Şekil 4.13).



Şekil 4.13 120 Saatlik Uygulama Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri
[*] çözücü kontrole göre farklarının önemini ifade eder ($p < 0.05$)

Çalışmamızda belirlemeyi hedeflediğimiz deltametrin ve thiaklopid karışımının, akciğer bronşiyal epitel hücrelerinde (BEAS-2B) olası toksik etkilerinden; DNA hasarını gösteren yöntemin bir parçası olarak, dozların uygulama süreleri sonrası 24 saatlik bir iyileşme süresi planlanmıştır.

Bu amaçla 24 ve 120 saat deltametrin ve thiaklopid karışımına maruz bırakılan hücrelerin, zaman uygulamaları sonrası besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücelere taze besiyeri eklenmiştir. Deltametrin ve thiaklopid içermeyen taze besiyeri eklendikten sonra, 24 saat inkübasyona (Recovery=iyileştirme periyodu) bırakılmıştır. Bu uygulama ile her iki zaman uygulamasında hücrelerde meydana gelen hasar sonrası, bu hasarın onarımı hakkında fikir edinebilmek için hücrelerin vermiş olduğu tepkilerin incelenmesi istenmiştir.

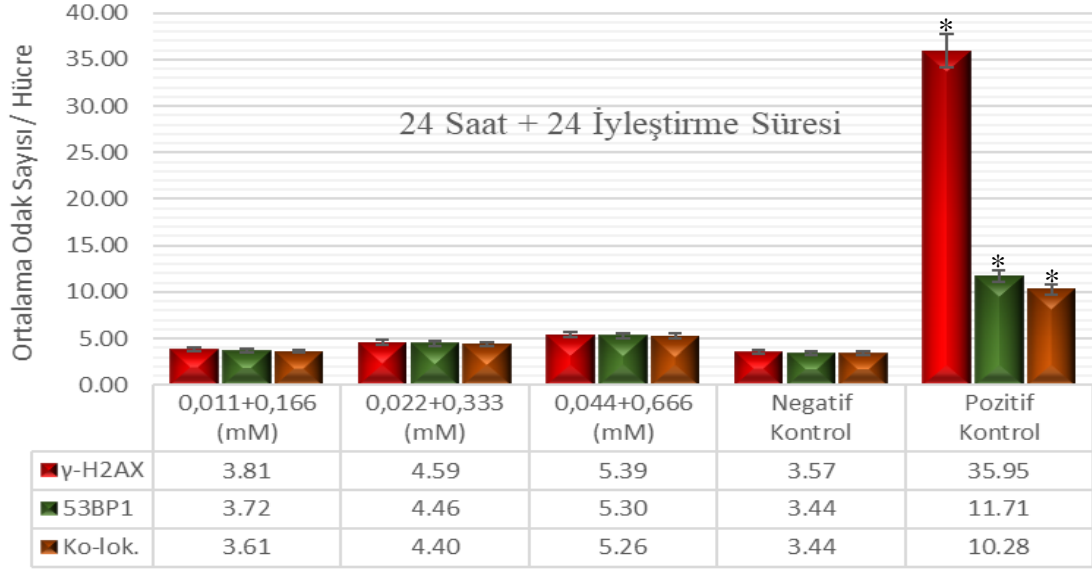
24 saatlik iyileştirme periyodu sonunda, ko-lokalizasyon yöntemi aynı şekilde uygulanarak hücre çekirdeklerinde odak oluşumları ve miktarları belirlenmiş olup, veriler istatistiksel değerlendirmeye alınmıştır.

Çizelge 4.9 24 ve 120 Saatlik Uygulaması Sonrası 24 Saat İyileşme Periyodu Uygulanan Gruplarda Doza Bağlı Olarak Hücre Başına Düşen Ortalama Odak Sayıları (3 deney tekrarından elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır)

Konsantrasyonlar (mM)		24 saat+24 saat Recovery			120 saat+24 saat Recovery		
Delt.	Thia.	γ -H2AX	53BP1	Ko-lok.	γ -H2AX	53BP1	Ko-lok.
0.001	0.016	3.81±0.83	3.72±0.71	3.61±0.66	5.33±2.23	5.31±2.18	5.31±2.18
0.022	0.333	4.59±0.84	4.46±0.64	4.40±0.54	6.94±2.34	5.71±2.41	5.45±2.05
0.044	0.666	5.39±1.68	5.30±1.63	5.26±1.57	16.94±2.84	9.50±2.35	8.48±2.48
Negatif Kontrol		3.57±0.76	3.44±0.84	3.44±0.84	3.99±0.85	3.99±0.85	3.99±0.85
Pozitif Kontrol (H₂O₂)		35.95±2.40	11.71±2.42	10.28±1.12	35.28±2.82	15.00±4.33	14.78±4.02

Deltametrin ve thiaklopidir karışım dozlarının 24 saat uygulandığı ve 24 saatlik iyileşme süresinin verildiği hücrelerdeki tüm odaklarda düşüş tespit edilmiştir. Bu azalmalar sonrası, doz gruplarının verileri çözücü kontrole karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamda bir farkın kalmadığı belirlenmiştir. Bu gruplarda DNA hasarının, etken maddelerin uzaklaştırılması ve hücreye hasarın onarımı için süre tanınması sonucu azaldığı görülmüştür.

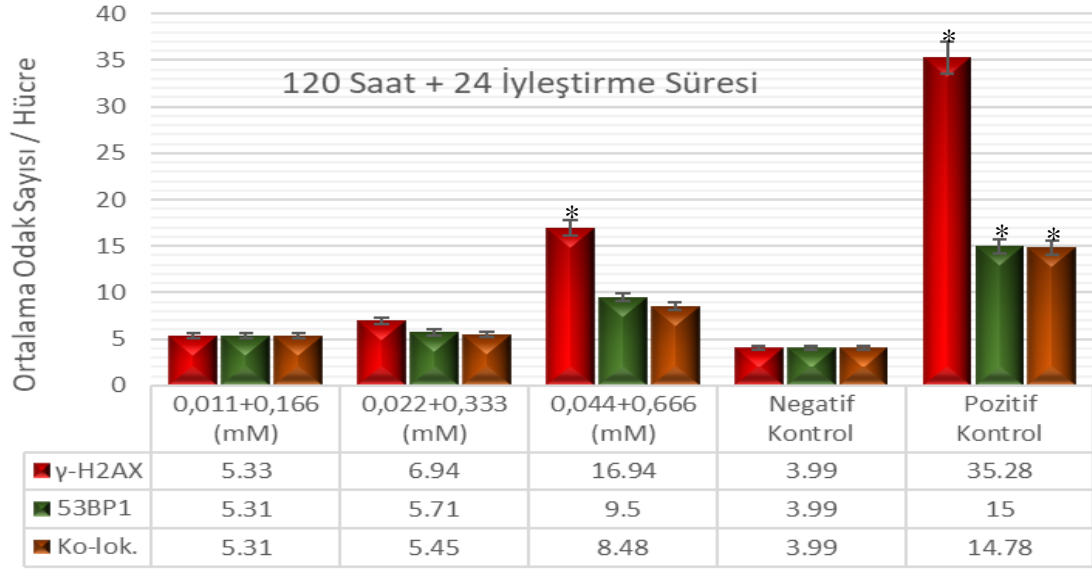
Doz gruplarının aksine, 53BP1 ve ko-lokalizasyon odaklarında büyük bir düşüş olsa da pozitif kontrol değerlerinin çözücü kontrole göre farkları istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) kalmıştır. İnsektisit karışım gruplarının odak değerleri, pozitif kontrole göre ($p<0.05$) önemli derecede farklılık göstermektedir (Çizelge 4.9, Şekil 4.14).



Şekil 4.14 24 Saatlik Uygulaması ve 24 Saat İyileştirme Süresi Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri [*] $p < 0.05$ çözücü kontrole göre farklılıkların önemini ifade eder

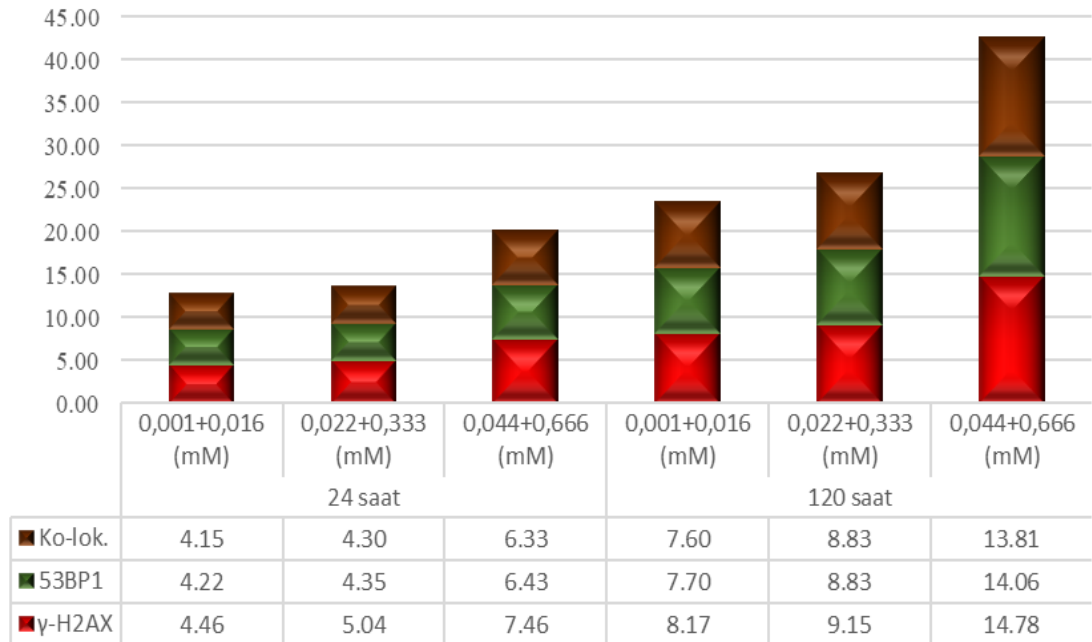
Deltametrin ve thiakloprid karışım dozlarının 120 saat uygulandığı ve 24 saatlik iyileştirme süresinin tanındığı diğer zaman noktasında elde edilen verilerde farklı değerler ortaya çıkmıştır. İyileştirme süresi sonunda deltametrin ve thiakloprid karışımının iki düşük dozunda (0.001 mM DEL + 0.016 mM THI ve 0.022 mM DEL + 0.333 mM THI) tespit edilen tüm odaklar, çözücü kontrol seviyesiyle aynı olmasa da aralarında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmaksızın azalmıştır ($p > 0.05$). Yüksek dozda (0.044 mM DEL + 0.666 mM THI) ise 53BP1 odakları ve ko-lokalizasyon, iyileştirme süresi ile gerilemiş, ancak çözücü kontrolle farkları istatistiksel öneme sahip ($p < 0.05$) olacak seviyelerde kalmıştır. Bu seviyeler pozitif kontrolün aynı odaklarındaki düşüşe benzerlik göstermektedir ve aralarında önemli bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Bu benzerlik yüksek dozun özellikle γ -H2AX odaklarının artışıyla da ortaya çıkmış olup, bu grubun γ -H2AX odak sayıları pozitif kontrolden farklı olduğu gibi, çözücü kontrol seviyelerinden de farklıdır. Aynı zamanda bu farklar istatistiksel olarak önem ($p < 0.05$) arz etmektedir (Çizelge 4.9, Şekil 4.15).

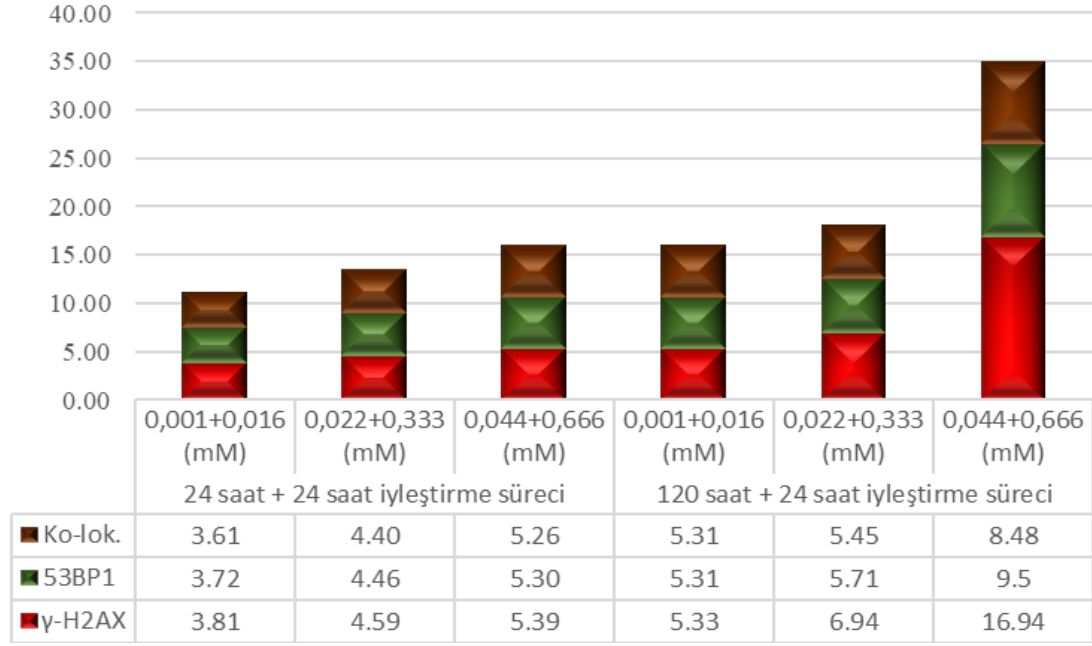


Şekil 4.15 120 Saatlik Uygulaması ve 24 Saat İyileştirme Süresi Sonucu γ H2AX ve 53BP1 Odaklarının Ayrı Ayrı ve Birlikte Lokalize Oldukları BEAS-2B Hücre Çekirdeklerinde Doza Bağlı Değişimleri
[*]p<0.05 çözücü kontrole göre farklılıkların önemini ifade eder

Ko-lokalizasyon test sonuçları; 24 ve 120 saat uygulamaları ve 24 saatlik iyileştirme süreleri sonunda tüm dozlara göre ortalama odak sayıları, iki ayrı yığılmış sütun grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17).



Şekil 4.16 Deltametrin ve Thiaklopid Karışımının Uygulamasının Oluşturduğu γ H2AX, 53BP1 ve Birlikte Lokalize Odakların 24 ve 120 Saat Dozlarına Bağlı Değişimlerin Yığılmış Sütun Grafiği ile Birlikte Gösterimi



Şekil 4.17 Deltametrin ve Thiakloprid Karışımının Uygulamasının 24 Saat + İyileştirme ve 120 Saat + İyileştirme Sürelerine ait Dozlara Bağlı γ H2AX, 53BP1 ve Birlikte Lokalize Odakların Değişimlerinin Yığılmış Sütun Grafiği ile Birlikte Gösterimi

Klonojenik, MTT ve immünohistokimyasal yöntemlerle test edilen çalışmamızın verileri; literatür verileriyle karşılaştırılıp sitotoksikite ve DNA hasarı ana başlıkları altında tartışılmıştır.

Birçok çalışma deltametrin'in memelilerde genotoksik, immünotoksik ve karsinojenik etkisinin olduğunu göstermiştir. Deltametrin'in sıçanlarda tiroit tümörleri ve farelerde lenfomaların sıklığında önemli artışlar meydana getirdiği tespit edilmiştir ve bu maddeye ait karışım grupları üzerinde de çalışmalar yapılması gerektiği sonucunu ortaya koymuştur (Cabral ve ark., 1990).

Oral, deri ve solunum yoluyla thiaklopride maruz kalma sonucunda karaciğerdeki detoksifikasyon enzimlerinin ve oral yolla alınmasından sonra steroid hormon sentezini sağlayan bazı enzimlerin aktivitelerinin yükselmesi nedeniyle, tekrarlayan dozlarda hedef organın karaciğer olduğu düşünülmektedir. Kemirici ve kemirici olmayan canlı grupları ile yapılan çalışmalarda, farklı thiakloprid dozlarının uygulanması sonucu, başlıca hepatoksisite ve tiroit toksisitesi belirlenmiştir (Şekeroğlu, 2010).

4.5 Sitotoksosite

Şekeroğlu ve ark., (2013) 24 saat ve 30 günlük deltametrin ve thiakloprid insektisitlerinin tek başlarına ve karışım halinde uygulanmasının sıçan (*Rattus norvegicus*) kemik iliği hücrelerinde, özellikle birlikte uygulamalarının mitotik indeksi (MI) istatistiksel olarak önemli derecede düşürdüğünü bildirmişlerdir. Sıçan kemik iliğinde insektisit karışımına bağlı olarak proliferasyonun azaldığını gösteren bu veri, çalışmamızda klonojenik ve MTT testleri ile elde edilen hücre canlılığındaki düşüşle paralellik göstermektedir. Elde edilen bu sonuç; çalışma konusunda ele alınan insektisitlerin memeli hücrelerinde sitotoksik potansiyeline işaret etmektedir.

Deltametrin'in 75 µg/ml'den yüksek dozlarda; insan periferik lenfositlerinde proliferasyon oranını (PI) ve mitotik indeksi (MI) düşürerek sitotoksik etki yarattığını bildirilen bir çalışmada, farklı hücreler kullanılsa da sonuçları elde ettiğimiz verilerimizle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Villarini ve ark., 1998).

Diğer bir *in vivo* araştırma ratlarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada deltametrinin 24 saatlik uygulamalarında tüm dozlarda mitotik indeksi'in (MI) düştüğü rapor edilmiştir (Agarwal ve ark., 1994). *In vivo* hücre bölünmesinin engellenmesiyle ilgili dozlarda sitotoksik potansiyel ortaya çıkmış olup *in vitro* deneylerimizde elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır.

Araştırmamızın sonucunda elde ettiğimiz sitotoksik veriler ile benzerlik gösteren bir literatür de, insan lenfosit kültürlerinde *in vitro* olarak deltametrinin genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmadır. 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında deltametrinin, nükleus bölünme indeksini (NBI) doza bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Surrallés ve ark., 1995).

Romero ve ark., (2012) deltametrinin ve özellikle iki metabolitinin insan sinir hücre kültüründe 10-1000 µM konsantrasyonlarda sitotoksik karakter gösterdiğini MTT testiyle belirlemişlerdir. Farklı hücre hattında çalışılmışsa da aynı yöntemle ve benzer dozlar uygulanarak (330, 660 ve 1330 µM) elde edilen veriler çalışmamızın verileriyle örtüşmektedir.

Baeza-Squiban ve ark., (1987) deltametrinin ticari formülasyonunun 50 ve 500 µM'lık konsantrasyonları fare fibroblast hücre kültüründe 72 saat için test etmişlerdir. Fare fibroblastlarında doza bağlı proliferasyon azalışı gözlemişlerdir. Aynı çalışmada,

insektisit ticari formülasyonunun hazırlandığı matriksin deltametrin'in hücreye girişini kolaylaştırdığı kontrollü deneylerle ortaya çıkarılmıştır. *In vitro* çalışma olması ve benzer dozlar kullanılması ve sonucu çalışmamıza benzer olup ticari formülasyon kullanılmamasına rağmen bu etkinin görülmesi, etken maddenin saf halinin de sitotoksik potansiyeline vurgu yapmaktadır.

Epitel morfolojili insan kemik iliği hücrelerinde (SH-SY5Y) yapılan yeni bir çalışmada, 50 ve 250 μM 'lık deltametrinin konsantrasyonları MTT testi ile 48 saatlik süre ile test edilmiştir. Deneyler hücre morfolojisinde değişikliklerin eşlik ettiği deltametrinin dozlarına bağlı şekilde hücre canlılığında önemli düşüşlerle sonuçlanmıştır (Ko ve ark., 2016). Hücre orijini ve morfolojisi ile doz benzerlikleri olan bu deney sonuçları, verilerimizi destekler niteliktedir.

Kemirgen timüs hücrelerinin toplanarak kültüre alındığı ve deltametrinin apoptogenik sinyal yolağına etkisinin incelendiği araştırmada 0.5, 1, 10, 25, 50 ve 100 μM deltametrin dozları 6 ve 18 saat süreyle uygulanmıştır. Deltametrin uygulama sürelerinde, hücre canlılığını doza bağlı olarak azaltmıştır. Ayrıca Kaspaz-3, Apoptotik DNA ve Annexin V analizleri, deltametrin'in apoptotik süreçleri indükleyerek hücre ölümünü artırdığı sonucuna varılmıştır (Kumar ve ark., 2014).

Memeli *in vitro* modelini oluşturan sıçan adrenal bez (PC-12) hücrelerinde MTT ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) gibi sitotoksisite kitleri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, hücrelere 48 saat süreyle deltametrinin 10-100 μM konsantrasyonları uygulanmıştır. Deltametrinin PC-12 hücrelerinde sitotoksisiteyi doza bağlı olarak önemli ölçüde arttırmıştır. Ayrıca hücre canlılığındaki bu dramatik düşüşün, ilgili yöntemler (sırasıyla DNA boyası Hoechst 33342 ve otofaji belirteçleri Beclin-1, p62, LC3-II'nin western blotlama analizi) kullanılmasıyla, apoptozis ve otofajiden kaynaklandığına karar verilmiştir (Park ve ark., 2017).

Kumar ve ark., (2014) ve Park ve ark., (2017) araştırma sonuçları sadece sitotoksisite açısından değil aynı zamanda bir sonraki bölümde apoptozis ile ilgili tartışmamıza da kaynak olabilecek türdendir.

Thiakloprid ile ilgili veriler, genellikle bu maddeyi içeren insektisitleri piyasaya sunan firma ve Çevre Koruma Ajansı'nın yayınlanmamış raporlarından öğrenilmektedir (Herbold, 1995a,b; Brendler-Schwaab, 1996a,b; EPA, 2005; FAO, 2010; WHO,

2016). Yakın zamanda artan ilgi ile sitotoksik ve genotoksik potansiyeli konusunda da bilim dünyasında farklı görüşler ortaya konan çalışmalar artış göstermektedir. Örneğin, yukarıda tartışılan adı geçen insektisitlerin karışımlarına ait etkilerin araştırıldığı tek *in vivo* çalışmada (Şekeroğlu ve ark., 2013) belirtildiği gibi thiakloprid'in tek başına uygulanması pozitif kontrol ve karışım kadar olmasa da mitotik indeksi düşürmüştür.

Bu insektisit karışımının incelendiği *in vivo* araştırma dışında tek başına thiakloprid ile yapılan çalışmalardan da örnekler sunabiliriz.

Bunlardan biri, Drážovská ve ark., (2013) thiakloprid'in ticari formülasyonu ile yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada sığır periferik lenfositleri kullanılmış olup, 30-480 µg/ml arasında çeşitli dozlar 24 ve 48 saat test edilmiştir. Her iki zaman noktasında özellikle yüksek dozlarda, PI'inde önemli düşüşler bildirmişlerdir. Çalışmamızda, karışım dozlarının 24 saatlik uygulamasının yüksek dozlarında klonojenik test ile azalmış hücre canlılığı tespit edilmiştir. 120 saat uygulaması ise daha düşük dozlarda daha yüksek sitotoksosite ortaya çıkarmıştır.

Calderón-Segura ve ark., (2012) tarafından 60-280 mM arası dozların iki saatlik süre ile insan periferik lenfositlerine uygulanması sonrası, en yüksek iki dozda anlamlı derecede sitotoksosite ve hücre ölümü gerçekleştiği belirtilen bir çalışma yapılmıştır. Lenfositlerin yüksek dozlara fakat kısa sürelerle maruz bırakıldığı çalışmadan elde edilen bu veriler, bizim daha düşük doz ama uzun uygulama sürelerinden elde ettiğimiz verilerimizle paralellik göstermektedir.

Kocaman ve ark., (2014) yürüttüğü çalışmada 75-150-300 µg/ml thiakloprid, 24 ve 48 saatlerde insan periferik lenfositlerinde test edilmiştir. Elde edilen veriler arasında thiakloprid'in MI, PI ve NBI'inde önemli düşüşler mevcut olup, bu veriler metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda deneysel olarak elde edilmiştir. Ayrıca bu düşüşler, zamana göre oransal yüksek dozlarda pozitif kontrol olarak kullanılan Mitomisin C (MMC) ve Siklofosfamid (CP) kadar gerçekleşmiştir. Bu çalışmada, thiakloprid'in tek başına aynı orijinden farklı bir hücre grubunda sitotoksosite açısından gösterdiği potansiyel insektisit karışımının incelendiği mevcut çalışmamızın sonuçlarını doğrular niteliktedir.

Bu kısımda son olarak tartışacağımız çalışma, yine tek başına thiaklopid etkisinin incelendiği yeni bir çalışmadır. Galdíková ve ark., (2015) yürüttüğü çalışmada sığırların lenfositleri kullanılmış olup, sonuçları hücre canlılığı açısından bu araştırmanın verilerine uymaktadır. Çalışmada 48 saat thiaklopid uygulamasının, sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

4.6 Hormesis

Hormesis konsepti biyoloji ve tıpta sıklıkla görülmektedir. Bu durum, bir kimyasalın düşük dozlarda gösterdiği etki ve yüksek dozlarda gösterdiği etki birbirinin zıddıdır. 1943 yılında Idaho Üniversitesindeki bir grubun, sedir ağaçlarından elde edilen ekstraların düşük dozlarda küf üretimini artırdığı ve yüksek dozlarda ise küflerin çoğalmasını engellediğini bildirmesi ile ilk kez literatüre geçmiştir (Southam ve Ehrlich, 1943).

Yapmış olduğumuz çalışmaları sonuçlarında da görüldüğü gibi delthametrin ve thiaklopid karışımlarının hormetik etkisi olabileceği düşünülmektedir. En düşük doz karışımları olan, 0.001 mM DEL + 0.016 mM THI ve 0.002 mM DEL + 0.033 mM THI, uygulamalarında kontrole göre çok daha fazla hücre artışı gözlemlenmiştir. Bu iki düşük doz karışımlarında MI'in yüksek olduğunu göstermektedir. Bu gözlemler diğer araştırmacıların pestisitlerle yaptığı çalışmaları desteklemektedir. Hormosis herbisit, insektisit, fungusit, gibi her tip pestisitlerde gözlemlenmektedir.

Bristo ve ark., (2017) yaygın olarak kullanılan roundup herbisitinin aktif maddesi olan glyphosatin hormetik etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bu etki glyphosate dirençli bitkilerde görülmemiş ama duyarlı bitkilerin hepsinde görüldüğü rapor edilmiştir. Duyarlı bitkiler düşük doz glyphosatale muamele edildiklerinde, elektron transport sistemi (ETS), CO₂ asimilasyonu (özümsemesi), ve stomaların iletkenliği gibi büyümeyi hızlandırıcı mekanizmaların arttığı, belirli genlerin ekspresyonlarında modifiye (değişiklik) olduğu, çiçeklenmenin arttığı ve biyolojik kütlede artış olduğu bildirilmiştir. Glyphosate yüksek dozlarda verildiğinde şikimik asit metabolik yolunda rol alan enolpuruvilshkimat-3-fosfataz sentetaz enziminin çalışmasını engeller. Bu metabolik yol fenilalanin, tirozin, triptofan gibi aromatik amino asitlerin üretiminden sorumludur. Bu amino asitlerin üretilmemesi ve dokudaki şikimik asit birikimi bitkinin ölümüne sebep olur. Glyphosatin büyümeyi artırıcı etkilere sebep olan dozu

ve fitotoksik dozu arasındaki fark çok küçüktür ve hormesise ne tip bir mekanizma aracılığıyla sebep olduğu bilinmemektedir (Brito ve ark., 2018).

Tang ve ark., (2019) flupyradifurone (FPD) adı verilen bir neonicodinoid insektisitinin subletal dozlar da hermetik etkisi olduğunu ve bu etkinin trans-generasyon (birbirini takip eden kuşaklar) olduğunu rapor etmiştir. Aynı thiakloprid gibi, FPD nikotonik asetilkoline geri dönüşümlü olarak bağlanır ve asetilkolin reseptörlerinin antagonistidir (Jeschke ve ark., 2015; Nauen ve ark., 2015).

Tang ve ark., (2019) FPD'nin LC₂₅ oranında *Myzus persicae* (Seftali yaprak biti) haşerelerine 48 saat süreyle uygulandığında F0 kuşağında tahmini yaşam süresinin kontrole göre 8-9 gün ve üretkenliğin kontrole göre dişi başına 22.96 yavrudan 11.75 yavruya düştüğünü ancak F1 kuşağında hem tahmini yaşamın hem de üretkenliğin önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir (Tang ve ark., 2019).

İnsektisitlerle yapılan diğer çalışmalarda da düşük ya da subletal dozların azinphos-methyl (Gordon ve McEwen, 1984) ve imidacloprid (Cutler ve ark., 2009) insektisitlerinin üretkenlik üzerine etkileri olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar subletal dozlara maruz kalan popülasyonlarda uygulamadan sonraki kuşaklarda üretim artışı nedeniyle ikincil popülasyon artışı (popülasyon patlaması) olabileceğini göstermektedir (Gordon ve McEwen, 1984; Cutler ve ark., 2009).

Deltametrin hormetik etkisini araştıran kuşaklar arası bir çalışma da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Deltametrinin subletal konsantrasyonlarına maruz kalan böceklerde eğer subletal doz muamelesi dört kuşak devam ederse dördüncü kuşak böceklerde ortalama ömrün uzamasına, yumurta da verimliliği ve pestisitleri detoksifiye eden enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin ifadesinin artmasına sebep olduğu görülmüştür (Sial ve ark., 2018).

Benzer sonuçlar, thiakloprid ile yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir. Bal arılarının laboratuvar koşullarında subletal thiakloprid dozlarına ve *Enterococcus faecalis* bakterisine aynı anda maruz bırakıldıklarında uygulamadan 11 gün sonra hayatta kalma oranları kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Dickel ve ark., 2018).

Yanlış uygulama, uygulama sırasında pestisit rüzgâr ya da su nedeniyle uygulama bölgesi dışına sürüklenmesi, uygulama sonrası çevrede kalan rezidüel pestisitler gibi

sebeplerden çevrede sürekli olarak subletal miktarlarda pestisitler kalmaktadır. Bu nedenle hem hedef hem de hedef olmayan organizmalar pestisitlerin hem letal hem de subletal dozlarına düzenli olarak maruz kalmaktadır (Duke, 2014). Bu nedenle pestisitler letal dozlarda direk ölüme sebep olurken subletal dozlarda hormetik etkiye sebep olmaktadır (Desneux ve ark., 2007; Biondi ve ark., 2013).

Bu veriler insektisitlerin hormetik etkisinin hedef organizmalar üzerinde olduğunu göstermektedir. Ancak literatür taramalarımız sonucu insan hücreleri üzerinde pestisitlerin hormetik etkisinin araştırıldığı yayınlara rastlanmamıştır.

Çalışmamızda deltametrin ve thiakloprid karışımının akciğer hücrelerinde olan hormetik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Insektisit karışımı 0.001 mM DEL + 0.016 mM THI ve 0.002 mM DEL + 0.033 mM THI dozlarında hücre çoğalmasının artmasına sebep olurken yüksek dozlarda toksik etkiye neden olmuştur.

Yukarıdaki referans çalışmalar, herhangi bir toksik ajanın düşük dozlarının yol açtığı ve ayrıca hücre'nin toksine maruz kalma süresi ve sıklığının da önemli olduğu hormetik cevabı destekler niteliktedir. Bu hormetik yanıt mekanizmalarından biri hücre çoğalmasdır. Düşük dozlarda bir toksine maruz kalan hücre, süreç her ne kadar tümör oluşumunu hatırlatsa da herhangi bir mutasyonel veya epigenetik DNA değişimi olmaksızın ve strese karşı koyma adaptasyonu olarak çoğalma-büyüme faktörlerinin sentezini artırabilir (Kısım ve Uzunoğlu, 2012).

İnsanlar pestisitlere genelde uygulama hatası, kıyafetlerin kontamine olması, koruyucu maske kullanılmaması gibi sebeplerle maruz kalmaktadır. Maruz kalınan dozlar ozonun alınacak olursa bunların genelde subtoksik olduğu görülecektir. Bu nedenle hücrelerde, bünye içerisinde, toksik etkinin yanı sıra hücre bölünmesini artırıcı bir etkisi olma olasılığı vardır. Bu etkinin biyolojik mekanizması bilinmediği için ne gibi sorunlara yol açabileceği henüz aydınlatılamamıştır. Bu konunun araştırılması ve buna göre kullanım kılavuzlarında gerekli uyarılara yer verilmesi insan sağlığı açısından çok önemlidir.

4.7 DNA Hasarı

Çalışmamızda deltametrin ve thiakloprid insektisit karışımının insan BEAS 2B bronşial hücreleri üzerindeki genotoksik etkisi DNA çift kırıklarına sebep olup olmadığı araştırılarak incelenmiştir. İlgili insektisitlerin genotoksik potansiyellerinin

tek başlarına incelendiği ve toksik etki açısından bazılarının pozitif değerlerinin ise negatif sonuçlarının gösterildiği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar literatürde mevcuttur. Literatürler özet olarak aşağıda, yapmış olduğumuz çalışma sonuçları ile karşılaştırılarak verilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmalara benzer olarak Kocaman ve Topaktaş, (2010) bir neonikotinoid ve bir piretroid karışımının toksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında neonikotinoid grubundan acetamipridin ve piretroid grubundan α -cypermethrinin insan periferal kan lenfositlerindeki genotoksit etkisini araştırmışlardır. Kocaman ve Topaktaş, (2010) acetamipridin ve α -cypermethrinin birlikte uygulandıklarında tüm süre ve dozlarda KKD'ni, KA'ni, MN oluşumunu önemli derecede arttırdığını göstermiştir. Hücrel anormalliklerde görülen artışlar doza bağlı olduğu ifade edilmiştir. Doz arttıkça genetik hasar artmış, hatta bazı durumlarda pestisit karışımının sebep olduğu genetik hasarın pozitif kontrol MMC'nin sebep olduğu genetik hasardan daha yüksek olduğu ileri sürmüşlerdir. Örneğin en yüksek konsantrasyon grubunda (20 + 10 $\mu\text{g/ml}$) hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulamada sitotoksik etki çok yüksek olduğu için binükleer hücreler sayılamamıştır. Acetamipridin ve α -cypermethrinin karışımı tüm konsantrasyonlarda hem 24 hem de 48 saatte mitotik indeksin (MI) ve 24 saat uygulama sonrası 12.5 + 2.5 $\mu\text{g/ml}$ dozunda proliferasyon indeksi (PI) kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca 15 + 5 $\mu\text{g/ml}$, 17.5 + 7.5 $\mu\text{g/ml}$ ve 20 + 10 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında hem kontrole hem de çözücü kontrolüne göre daha düşük olmasına sebep olmuştur. Acetamipridin ve α -cypermethrinin karışımı, ayrıca tüm dozlarda ve tüm zamanlarda NBI'da önemli düşüklüğe sebep olmuştur. Pestisit karışımının genotoksit etkileri tek başına pestisite maruz kalan hücrelerle karşılaştırıldığında karışımın genotoksik etkisinin pestisitlerin tek başına etkisine eşit ya da daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Kocaman ve Topaktaş, 2010). Aynı maddeler kullanılmamış olsa bile çalışmamızda kullandığımız deltametrin ve thiakloprid ile aynı grupta yer alan insektisitler olması nedeniyle bu çalışma sonuçları bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.

Deltametrin'in farelerde kemik iliğinde kromozom hasarlarına (KH) ve mikronükleuz (MN) oranlarını (Bhunya ve Pati, 1990; Agarwal ve ark., 1994; Gandhi ve ark., 1995; Grisolia, 2002; Chauhan ve ark., 2007) ve kardeş kromatit değişimlerini (KKD) önemli derecede artırdığı bildirilmiştir (Chauhan ve ark., 1997). Deltametrin uygulanan

farelerde doz artışına bağlı olarak, dominant letal mutasyon oranında küçük bir artış meydana geldiği gösterilmiştir (Shukla ve Taneja, 2000). Deltametinin insan periferal lenfositlerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise deltametinin KKD frekansını hafif bir şekilde artırdığını (Dolara ve ark., 1992), DNA hasarını arttırdığı (Villarini ve ark., 1998), KH ve MN oranlarını arttırdığı belirtilmiştir (Chauhan ve ark., 2007). Sonuçlardaki farklılık uygulama süresi, uygulama dozu ve uygulama yollarının farklı olması ile açıklanabilir.

Yaygın olmamakla beraber bazı literatürde, odak oluşum yöntemi kullanılarak deltametinin veya farklı insektisitlerin DNA hasarına etkilerinin incelendiği veya başka DNA fragmantasyon ve apoptozis sinyal belirteçleri kullanan çalışmalar mevcuttur (Enan ve ark., 1996; Zou ve ark., 2002; Çavaş ve ark., 2012; Hsu ve ark., 2012; Guanggang ve ark., 2013; Li ve ark., 2015). Bunların ilk örneklerinden olan Enan ve ark., (1996) deltametinin 50 µM'lik dozunun 24 saatlik uygulamasının timüs hücrelerinde DNA fragmantasyonuna neden olduğunu gözlemiştir.

Hong ve ark., (2018) bir yengeç türünü (*Eriocheir sinensis*) çeşitli deltametrim konsantrasyonlarına tabi tuttuklarında eritrositlerde mikronükleus oluşumunun 1/4, 1/2 ve 1/1 LC₅₀ konsantrasyonlarında arttığını gözlemlediklerini bildirdiler. Araştırmacılar ayrıca eritrositlerde comet ve DNA kuyruğu oluşumunda da önemli bir artış olduğunu bildirdiler. Bu sonuçlar deltametinin *E. sinensis* üzerinde hem toksik hem de subtoksik konsantrasyonlarda önemli derecede genotoksik etkisi olduğunu bildirdiler (Hong ve ark., 2018). Çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar Hong ve ark., (2018) bulgularını kısmen desteklemektedir. Bizim çalışmalarımızda genotoksik etki yüksek dozlarda uzun süreli uygulamalar sonrası görülmüştür. Ancak yapmış olduğumuz çalışmada insan hücrelerinde *in vitro* olarak yapılmış ve moleküler bir mekanizmayı incelemiştir. Hong ve ark., (2018) ise yengeç hücrelerinde kromozomlarda olan değişiklikler mikronükleus ve comet testleri ile incelenmiştir. Sonuçlardaki farklılıklar metod ve deneklerdeki farklılıklar sonucu olabilir.

Zou ve ark., (2002) tarafından yürütülen deltametrim ile ilgili çalışmada 0.1 µM deltametrim dozunun MCF-7 hücrelerinde, γ-H2AX odak oluşumuna etkisi incelenmiş ve önemli bir etki gözlenmemiştir. Araştırmacıların ekzojen etkilere daha dirençli olduğu bilinen meme kanser hücresi ile çalışmış olmaları ve literatür ortalamalarına

oranla düşük bir doz seçmiş olmaları çalışmamızdan elde edilen sonuçların bu araştırma verileriyle uyumlu olmamasının muhtemel sebepleri olarak görülmektedir.

Hsu ve ark., (2012) deltametrinin insan glioblastoma hücrelerinde apoptozise sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada kemirgen timüs hücreleri toplanarak kültüre alınmış ve deltametrinin apoptogenik sinyal yolağına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada 0.5, 1, 10, 25, 50 ve 100 µM deltametrin dozları 6 ve 18 saat süreyle uygulanmıştır. Kaspaz-3, Apoptotik DNA ve Annexin V analizleri ile, deltametrinin deney şartlarında DNA hasarına sebep olarak apoptotik süreçleri indüklediği sonucuna varılmıştır (Kumar ve ark., 2014).

Deltametrin ile Pakistan'da yapılan bir çalışmada, pamuk tarlalarında çalışan, pamukları çıplak elle toplayan, koruyucu kıyafet kullanmayan kadın tarım işçilerinin hücrelerinde görülen DNA hasarı comet metodu ile incelenmiştir. Kontrol grubunun ve tarım işçilerinin gruplarının kan serumlarındaki pestisit seviyesi HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar tarım işçilerinin kan serumlarında üç farklı pestisit (cyhalothrin, endosulfan, ve deltametrin) kontrol grubuna göre çok yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiş ve DNA hasarı tarım işçilerinde kontrole göre çok daha yüksek bulunmuştur. Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz veriler bu sonuçları desteklemektedir. Deltametrine maruz kalan hücrelerde DNA hasarı deltametrine maruz kalmayan hücelere göre daha yüksektir (Ali ve ark., 2018).

Memeli *in vitro* modeli oluşturan sıçan adrenal bez (PC-12) hücrelerinde MTT ve LDH gibi sitotoksikite kitleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, hücelere 48 saat süreyle deltametrinin 10-100 µM konsantrasyonları uygulanmıştır. Deltametrinin PC-12 hücrelerinde doza bağlı olarak hücre canlılığında görülen dramatik düşüşe apoptozis ve otofajinin dahil olduğuna, ilgili yöntemler (sırasıyla DNA boyası Hoechst 33342 ve otofaji belirteçleri Beclin-1, p62, LC3-II'nin western blot testi) kullanılarak karar verilmiştir (Park ve ark., 2017). Çalışmamızın ko-lokalizasyon deneylerinde; insektisit karışımının zamana ve doza bağlı olarak DNA hasar belirteci odaklarının oluşumunu arttırdığı gözlenmiş olup, tamir belirtecinin oluşturduğu odaklar da azalma eğilimi göstermiştir. Bu veriler, Enan ve ark., (1996), Zou ve ark., (2002), Hsu ve ark., (2012),

Kumar ve ark., (2014) ve Park ve ark., (2017) ile karşılaştırıldığında akciğer bronşiyal hücrelerinde apoptotik sürecin işlediği izlenimi vermektedir.

Kumar ve ark., (2018) deltametrinin sebep olduğu sitotoksik etkilerin mekanizmasını *in vivo* olarak araştırmışlardır. BALB/c farelerine yedi gün boyunca 5 mg/kg deltametrin ağız yoluyla verildiğinde farelerde zayıflama ve hücre canlılığında azalma görmüşlerdir. Farelerde reaktif oksijen türleri ve glutation miktarında azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Hem reaktif oksijen türlerindeki artış hem de glutationun azalması hücrelerde oksidatif strese sebep olmaktadır (Kumar ve ark., 2018). Oksidatif stresin en önemli hasarlarından birisi DNA'da mutasyonlara sebep olmasıdır.

Yukarıdaki çalışmalarda ve bizim çalışmalarımızda görülen DNA hasarlarının sebebi deltametrinin sebep olduğu oksidatif stres olabilir.

Thiaklopid'in genotoksik etkisi, Chinese hamster V79 hücrelerinde üç farklı konsantrasyonda *in vitro* KH testi ile çalışılmış ve metabolik aktivasyon sisteminin varlığında ve yokluğunda hiçbir konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli artışlar saptanamamıştır (Herbold, 1995a). Thiaklopid'in dişi ve erkek farelerde *in vivo* MN oluşumunun incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada ise, kontrol grubuna göre MN frekansında istatistiksel farklılık görülmemiştir (Herbold, 1995b).

Thiaklopid'in yer aldığı dört farklı pestisitinin genotoksitesinin comet testi ile belirlendiği farklı çalışmada, bu insektisitinin periferik lenfositlerde önemli ölçüde DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir (Calderón-Segura ve ark., 2012). Bu çalışmanın sonuçlarına benzer olarak, thiaklopid'in doz ve muamele süresinin artışına bağlı olarak komet testinde kuyruk oluşumunu ve KKD oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir (Drážovská ve ark., 2013).

Kocaman ve ark., (2014) yaptığı çalışmada thiaklopid ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KH, KKD ve MN oranlarında artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Yine sığır lenfositlerindeki bir çalışmada thiaklopid'in 48 saatlik uygulamasının KKD frekansını arttırırken, MN oluşum frekansında bir artışa sebep olmadığı rapor edilmiştir (Galdíková ve ark., 2015). Bu literatürlerden üretici firma raporları dışında Galdíková ve ark., (2015) yapmış olduğu çalışma verileri yapmış olduğumuz çalışmaların verileriyle uyum göstermemektedir. Genel olarak thiaklopidin toksik yapısı, özellikle DNA'ya hasar verme potansiyeli belirsizliğini

korumaktadır. Bu nedenle thiakloprid'in tek başına veya preparat olarak deltametrin ile karışımının ayrıntılı olarak araştırılması bu hususu açıklığa kavuşturacaktır.

Şenyıldız ve ark., (2018) yaygın olarak kullanılan dört neonikotinoid insektisit (acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiakloprid, and thiamethoxam) sitotoksik ve genotoksik etkilerini insan noroblastoma (SH-SY5Y) ve karaciğer karsinoma hücreleri (HepG2) kullanarak araştırmışlardır. Deneylerde kullanılan beş insektisit LC₅₀ değerleri SH-SY5Y hücrelerinde 0.96->4 mM olarak ve HepG2 hücrelerinde 0.53->4 mM olarak bulunmuştur. MTT hücre canlılığı testi ve nötral kırmızı hücre canlılığı testi kullanılarak bu pestisitlerin sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat pestisit uygulamasından sonra araştırılmıştır. Beş insektisit de hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca alkalın comet deneyi ile bu insektisitlerin DNA hasarına sebep olup olmadığını gözlemlemişlerdir. Sonuçlar 24 saatlik uygulama sonunda 500 µM konsantrasyonda beş insektisit SHSY-5Y hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğunu HepG2 hücrelerinde ise sadece imidacloprid, thiametoxam, ve thiaklopridin DNA hasarına sebep olduğunu göstermiştir (Şenyıldız ve ark., 2018). Bu sonuçlar yapmış olduğumuz deneylerin sonuçlarını desteklemektedir. Ancak bu çalışmada kullanılan hücrelerin her ikisi de kanser hücresidir. Kanser hücreleri genetik açıdan stabil olmadıkları ve mutasyona daha yatkın oldukları için kanser hücrelerde tespit edilen DNA hasarı normal hücrelerinkinden daha yüksek oranda olabilir.

Yukarıdaki çalışmalar genelde tek bir pestisit *in vivo* ya da *in vitro* olarak sitotoksik ya da genotoksik etkisini araştırmaktadır. Daha önce de değinildiği gibi bugün tarım alanlarında pestisitlere direnci engellemek amacıyla çoğunlukla pestisit karışımları kullanılmaktadır. Ayrıca, özellikle sucul ortamlarda pestisitler topraktan yağmurla sürüklenerek getirildikleri için doğada karışım olarak bulunmaktadır. Pestisit karışımlarıyla yapılan sınırlı sayıda genotoksik etki araştırılan çalışmalar bulunmaktadır.

Ambreen ve Javed, (2018) alkalın comet testi kullanarak endosülfan ve klorpirifos karışımına 70 gün süreyle maruz bırakılan tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un (Nil Tilapyası) periferal kan eritrositlerindeki DNA zinciri kırıklarının oluşumunu incelemişlerdir. Uzun süreli genotoksik testler yalnız DNA hasarının tespit edilmesine

değil aynı zamanda organizmanın tamir (recovery) yeteneğini gözlemeye de fırsat verdiği için genetik çalışmalar açısından önemlidir. Bu çalışma sonunda araştırmacılar endosülfan ve chloropyrifos subletal dozuna maruz kalan balıkların kan hücrelerinde kontrol grubuna göre çok yüksek miktarda DNA hasarı olduğunu göstermişlerdir (Ambreen ve Javed, 2018).

En yaygın olarak kullanılan pestisit karışımlarından biri olan endosülfan, klorpirifos ve thiram karışımının insan lenfositlerindeki genotoksik etkisi comet deneyi kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmada insanların maruz kalabileceği bir doz olan 5 mM'lik (her pestisit için) doz kullanılmıştır. Pestisit karışımına maruz kalan lenfositlerde DNA hasarının kontrole göre çok daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Tope and Rogers, 2009).

Polard ve ark., (2011) yaygın olarak kullanılan beş pestisit karışımının (metolachlor + isoproturon + chlorotoluron + atrazine + deethylatrazine) DNA hasarına sebep olup olmadığını sazan balığında (*Carassius carassius*) incelemişlerdir. Bu çalışma Fransa'da Save Nehrinde yapılmıştır. Çalışma sırasında nehirde su normal nehir koşulları altında, ilkbahar selleri sırasında ve kış selleri sonrasında alınmıştır. Sudaki pestisit konsantrasyonları incelendiğinde ilkbaharda en yüksek pestisit oranının olduğu görülmüştür. *C. carassius*'ların periferik kan hücrelerinde hem micronucleus hem de comet testiyle tespit edilmiş DNA hasarının kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve ilkbaharda hasarın en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Polard ve ark, 2011).

Ülkemizde deltametrin ve thiakloprid karışımı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu karışımla yapılan yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Şekeroğlu ve ark., (2013) 24 saat ve 30 günlük sürelerde deltametrin ve thiakloprid insektisitlerini tek başlarına ve karışım halinde sıçan (*Rattus norvegicus*) kemik iliği hücrelerine uyguladığı araştırmanın verileri incelendiğinde: DNA kırığı kaynaklı kromozom hasarı (KH), mikronucleus (MN) oluşumu, akut ve subkronik olarak her iki uygulama süresinde de kontrole göre önemli derecede artmıştır. Bu in vivo çalışmada, insektisit ticari formülasyon şeklinde kullanıldıklarını hatırlatarak, insektisitlerin DNA hasarı meydana getirme potansiyelleri hakkında ortaya çıkan fikirlerin, bu tezin bir bölümünü oluşturan ve DNA hasar lezyonlarını/onarımını işaret eden protein odakları verilerince in vitro olarak doğrulandığı düşünülmektedir.

Hücrenin sağlığının bozulmasına neden olacak faktörlerin en önemli belirteci DNA hasarıdır. Bu nedenle DNA hasarının ve tamirinin etkili bir şekilde ölçülmesi çok önemlidir. DNA hasarının ölçülmesi için yaygın olarak kullanılan metotlar mikroskopik teknikler, analitik teknikler, kemiluminasans teknikler ve moleküler teknikler olarak gruplandırılabilir. Bu tekniklerin hepsinin DNA hasarını belirleyen kuvvetli ve zayıf yanları vardır. Örneğin mikroskopik tekniklerden mikronükleus testi genotoksik etkiyi kromozom seviyesinde ölçer. Bromodeoksiuridin işaretlenmiş DNA comet floresans in sti hibridizasyon tekniği (FISH) DNA'nın bölgelere spesifik olan kırılmalarını ölçer. Halo deneyleri kromatinlerin kırılmaya yetkinliğini ölçer (kromatin fragility). Eğer DNA hasarı farklı bir sebeple meydana gelmişse bunu göstermeleri mümkün değildir. Bu nedenle bir maddenin genotoksik potansiyeli ölçülürken birden farklı metodun kullanılması çok önemlidir (Figueroa-González ve Pérez-Plasencia, 2017).

2,4-dimethylaniline (2,4-DMA) kimyasalı aromatik bir amindir. Yaygın olarak fotoğrafçılıkta kullanılan kimyasalların boyaların ve pestisitlerin içine katılır. Son yıllarda Japonya'da 2,4-dimethylaniline (2,4-DMA) kimyasalı ile çalışan işçilerde mesane kanserinde büyük bir artış görüldüğünü ve bu artışın işçilerin 2,4-DMA ile çalışması sonucu olduğu ileri sürülmüştür (Nakano ve ark., 2018). Bu kimyasalın genotoksik etkileri yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite testleri ile 1980 yıllarda araştırılmış ve genotoksik etkisi ile ilgili çelişkili raporlar yayınlanmıştır. Bazı araştırmacılar metabolik olarak aktive edildiğinde Ames testinde genotoksik etki bulunduğunu (Zeiger ve ark., 1988). Diğer araştırmacılar sıçan karaciğer hücrelerinde genotoksik etki rapor etmişken (Yoshimi ve ark., 1988; Williams ve ark., 1989) diğerleri genotoksik etki olmadığını bildirmişlerdir (Zimmer ve ark., 1980). Bu çalışmalar birbiri ile çelişkide olduğu için 2,4 DMA kansere sebep olan maddeler kategorisinde değil, kansere sebep olabilir kategorisine değerlendirilmiştir.

Japonya'da görülen mesane kanseri olaylarında ki artış, bu kimyasalın yeniden incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmış ve Qi ve ark., (2018) yakın zamanlarda çıkan, bizim bu araştırmamızda kullandığımız, genotoksisite incelenmesinde kesin sonuçlar veren H2AX kolokalizasyon testi kullanarak DNA hasarının kesin olarak ortaya çıktığını göstermişlerdir.

Buna benzer olarak pestisitlerin pek çoğu farklı DNA hasar mekanizmaları metotları ile incelenmiş ve kimi pestisitler çelişkili sonuçlar vermiştir. Bu pestisitlerin son yıllarda daha kesin sonuçlar veren kolokalizasyon testi ile denenmesi ve genotoksisite etkileriyle ilgili çelişkilerin ortadan kaldırılması önemlidir.

Deltametrin ve thiakloprid karışımının genotoksik etkisini araştıran tek bir makale vardır (Sekeroğlu ve Kefelioğlu, 2011). Bu nedenle kolokalizasyon testi kullanılarak genotoksik etkisinin araştırılması literatüre önemli bir katkıda bulunacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsektisitler; özellikle oksidatif stres ve DNA ile etkileşip tek zincir ve/ya çift zincir lezyonlarını indükleyerek genomik kararsızlığa yol açarak, kromozomal anormalliklere ve sonunda tümör oluşumuna neden olabilen güçlü toksik maddelerdir. Bu nedenle sito-genotoksisitelerinin güncel ve geçerliliği kabul edilen *in vitro* ve/ya *in vivo* yöntemlerle kontrolden geçirilmeleri gerekmektedir.

İnsektisitler ve bu insektisitlerin karışımları ya da metabolitleri ekzojen güçlü birer oksidatif stres kaynağı olabileceği gibi (Aydın, 2011; Kryston ve ark., 2011), DNA eklentileri meydana getirebilir (Heinzow ve McLean, 1994; Shah ve ark., 1997) ya da düşük doz iyonize edici radyasyon dahil çevresel faktörlerden daha yüksek sıklıkta ve seviyelerde DNA lezyonlarına sebep olabilen endojen kaynaklı hasarı (Kryston, 2011) onaracak DNA tamir proteinlerini veya sinyal proteinlerini eklentiler oluşturarak fiziksel inhibisyona uğratabilirler (Angerer ve ark., 2007; Noort ve ark., 2008).

Hücresinin ölümüne neden olmadan DNA tek zincir kırıklarına sebep olabilen bu etkilerden sorumlu çevresel faktörlere daha yoğun maruz kalan hücrelerde, bölgesel çoklu hasar alanlarının birikerek onarılması zor ve çok sayıda çift zincir kırıklarına dönüşebileceği fikri ortaya atılmıştır (Ward ve ark., 2003b).

Tüm hücreler aynı uyarana cevaben ölmek zorunda olmayıp (Elmore, 2007), özellikle apoptotik uyarıcı uzaklaştırılırsa p53-indüklü erken safha apoptotik hücreler; bu programdan kurtarılabilir. Bunun için, erken safhada DNA tamirinin aktif olduğu ve bazı şartlarda hücre ölümünün geri çevrilmesine dahil olabileceği önerilmiştir (Geske ve ark., 2001). Eğer bu mekanizma iş görürse, DNA hasarında olduğu gibi apoptozis boyunca da fosforillenmiş hale geldiği bilinen H2AX varyantının (Elmore, 2007) ölçümünde azalmalara, kalıcı 53BP1 odaklarına veya bunların artışı eşlik etmelidir.

H2AX varyantının fosforilasyonunun (γ -H2AX) indüklenen DNA çift zincir kırıklarına verilen ilk hücresel yanıtlardan biri (Lu ve ark., 2006) olmasının yanı sıra, primordiyal hücrelerde embriyonik gelişim sürecinde de başvurulan ve çeşitli stres (ısı şok, oksidatif, osmotik, translasyonel vb.) faktörlerinin aktive edebileceği JNK/SAPK sinyali (Lu, 2006; Dhanasekaran ve Reddy, 2008; Cook ve ark., 2009) gibi apoptotik süreçlerde kaspaz aktivasyonu sonrası, apoptotik sona doğru endonükleaz aracılı DNA

fragmantasyonuna da verilen eş zamanlı hücrel bir cevap olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Rogakou ve ark., 2000; Mukherjee ve ark., 2006).

Çalışmanın akciğer bronşiyal epitel hücrelerine 120 saat insektisit karışımı uygulamasının yüksek dozunda gözlenen γ -H2AX artışı ile, yukarıda bahsedilen uyarıcılara yanıt olarak gelişen apoptotik yolların çeşitli kademelerine eşlik eden, fosforillenmiş H2AX seviyeleri arasında benzerlik kurmak mümkündür. İnsektisit karışımlarının farklı hücre tiplerinde oksidatif etkilerinin incelendiği ek çalışmalarda bu olasılığa ışık tutabilecektir. Ayrıca tezin girişinde de bahsedildiği gibi, literatürdeki zehirlenme vakalarında ve dahası ilgili insektisitlerin organizmadaki metabolizması sayesinde böbrek dokusu hedef dokulardan biridir. Bu sebeple insan böbrek hücre hattında benzer bir in vitro çalışma planlanmalıdır.

Hücrede gama-H2AX odaklarının kalıcılığı ve/ya artışının yanında, DNA hasar onarım moleküllerinin hasar bölgesine çağrılması ve bu proteinlerin toplanarak gözlenebilir odaklar oluşturmasında kritik rolü olan 53BP1 odakları (Ward ve ark., 2003b), 120 saatlik uygulamada en yüksek dozda pozitif kontroldeki azalmaya benzer bir eğilim göstermektedir. İkisi birlikte DNA hasar onarımında bir eksiklik/zayıflığı ve apoptotik sürecin başlamış olabileceğini akla getirmektedir.

Farklı hücre tiplerinde radyasyon uygulaması sonrası geçen süre sonunda, DNA çift zincir kırık (DSB) bölgelerinde odak oluşumu ile klonojenik sağkalımın zayıf bir şekilde ilişkilendirildiği rapor edilmiştir. Bu ilişki sadece uygulamadan 12 saat sonra tespit edilmiş olup 24 saat için söz konusu değildir (Marková ve ark., 2007). Radyoaktivite, DNA hasarı meydana getiren en güçlü fiziksel etkenlerdendir. Farklı hücre tiplerinin değişken radyo-duyarlılığı ve farklı kimyasal fiziksel etkenlerin hücrede farklı hareket tarzlarının olması, hücrel cevabın çeşitlenmesini doğurmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda farklı etken ve hücre tiplerinin kullanılması sonucu elde edilen verilerin, düşük hücrel sağkalımı odak oluşumundaki artışla ilişkilendirilmesi olağandır. Dahası bu ilişki, korelasyon katsayısı analizi ve regresyon eğrisi kullanılarak istatistiksel olarak da açığa kavuşturulmuştur.

Bilimsel çalışmaların başında kurulan sıfır hipotezler, tasarlanan deney kondisyonlarında test edilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmaların verileri, ilgili deney şartları göz önüne alınarak değerlendirilmekte ve bir sonuca varılmaktadır. Bununla

beraber, yeterli sınıma tekrarları sonrası benzer şartları kullanan farklı bilimsel araştırma sonuçlarının bütünü dikkate alındığında ortak ve bilimsel bir doğruya ulaşılabilmektedir. İnsektisitlerin ve beşerî ilaç maddelerinin karışım halindeki preparatlarının kullanılması bu tür kimyasalların karışımdaki etki mekanizmaları ve birbirlerini nasıl etkiledikleri konusunda sinerjistik ve antagonistik tarzlarının belirlenmesi gerekmektedir. Çalışmamıza konu olan insektisitlerin tek başlarına toksik potansiyelleri hakkında bir fikir oluşmuşsa da etken maddelerin karışımı veya karışım halindeki ticari formülasyonunun belirli potansiyellerini belirtmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

DNA çift zincir hasarının onarımında iş gören proteinlerin gen ekspresyonlarının veya floresan yöntemle immünohistokimyasal olarak tespiti, toksisitenin olası mekanizmalarına ışık tutabilir. Ayrıca apoptotik belirteçlerin (Mitokondri zar potansiyeli, Bax/Bcl-2 proteinleri veya Kaspaz sistemi enzimleri, DNA ladder oluşumu vb.) inceleneceği daha ayrıntılı çalışmalar tasarlanarak, karışım halindeki bu tip çevresel kirleticilerinin biyolojik sistemlere ve özellikle insana etki potansiyelleri hakkında daha çok bilgi edinilmelidir. Böylece söz konusu maddelerin gerekiyorsa üretim aşamalarında kontrolü ve daha sonra kullanım sürecinde gerekli ve yeterli risk değerlendirmeleri ve risk yönetimleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilir.

Pestisitlere en fazla maruz kalan tarım ve hayvancılık ile uğraşan kişilerdir. Bu nedenle tüm çalışanların pestisitler konusunda bilgilendirilmesi şarttır. Ülkemizde Çalışma ve Sosyal Güvenlik Eğitim Araştırma Merkezi tarafından yürütülen faaliyetler ve broşürler ile eğitim ve bilgilendirme çalışmaları yapılmaktadır. ÇASGEM; tarımda iş sağlığı ve güvenliğinde en tehlikeli kimyasallar tarım ilaçları (pestisitler) olduğunu belirtmiştir. Tarım çalışanlarının periyodik sağlık kontrollerini yaptırması ve bu raporları dosyalayıp saklaması gerektiğini vurgulanmıştır. Ayrıca eldiven, ayakkabı, koruyucu iş elbisesi, göz, yüz ve solunum koruyucularını kullanmalı ve çalışırken çıkarmamaları gerektiği vurgulanmıştır. Özellikle pestisitlerin hazırlanması ve uygulanması sırasında; ilaçlar talimatlara göre hazırlanmasına ve uygulanmasına, toz kimyasallarla çalışılırken solunmasına, sıvı kimyasallarla çalışılırken de sıçramasına karşı önlem alınmasına önem verilmesi istenmiştir. Tarımda özen gösterilmesi gereken önemli bir konu da başta su kaynakları olmak üzere, çevreyi korumaktır. Bunun için,

kullanılan kimyasalların su kaynaklarına ulaşması ve katı/sıvı maddelerin veya atıkların su kaynaklarına atılmaması gerektiği belirtilmektedir (Anonim, 2019).

Kullanılan pestisit çeşitleri ayrı ayrı kullanılsa bile sulama ve yağmur sularının sürükleyici, yıkıcı ve çözücü etkisiyle bir araya gelmektedir. Aynı bölgede farklı zamanlarda kullanılan veya birbirine yakın bölgelerde ayrı ayrı kullanılan pestisitlerin yeraltı sularına, buradan sucul ekosistemlere ulaşmaktadır. Ayrıca uygulama alanlarında beslenen diğer canlılarda bu pestisitlere maruz kalmaktadır. Dolayısıyla hem suda hem de bu suyu içen organizmalarda birbirleri ile etkileşmeleri kaçınılmaz bir durumdur. Ekosistemlerdeki karmaşık besin ağı düşünüldüğünde, tüm komünite üyelerinin pestisitlere maruz kalmaktadır. Son tüketiciye doğru gidildikçe vücuttaki zehir birikimin arttığı ve toksisite değerinin de doz artışına bağlı olarak yükseldiği, bu nedenle pestisitlerin hedef olmayan canlıların zarar verdiği birçok örnek mevcuttur. Farklı türdeki pestisitlerin ekosistemlerdeki etkileşimlerinin sonuçlarının belirlenmesi oldukça zor bir durum olsa da üretilen tüm tarım ilaçlarının detaylı testler uygulandıktan sonra piyasaya sürülmesi gerekmektedir. Özellikle bu tür kimyasalların sentetik olmaması ve doğada yarılanma ömürlerinin kısa olması ekosistem dengesinin korunması ve halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Ayrıca mümkün olduğunca biyolojik mücadele yollarının kullanılması ve organik tarımın teşvik edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Daim, M. M., Abuzead, S. M. M., & Halawa, S. M. (2013). Protective role of *Spirulina platensis* against acute deltamethrin-induced toxicity in rats. *Plos One*, 8(9), e72991.
- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaiee, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), RA141-RA147.
- Agarwal, D. K., Chauhan, L. K. S., Gupta, S. K., & Sundararaman, V. (1994). Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 311(1), 133-138.
- Aguilera, A., & Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 204-217.
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12.
- Alavanja, M. C. R., Dosemeci, M., Samanic, C., Lubin, J., Lynch, C. F., Knott, C., & Blair, A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *American Journal of Epidemiology*, 160(9), 876-885.
- Alexander, F. E., Patheal, S. L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M. E., Chan, L. C., & Greaves, M. F. (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Research*, 61(6), 2542-2546.
- Ali, T., Ismail, M., Asad, F., Ashraf, A., Waheed, U., & Khan, Q. M. (2018). Pesticide genotoxicity in cotton picking women in Pakistan evaluated using comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 213-220.
- Alvarez-Moya, C., Reynoso Silva, M., Valdez Ramírez, C., Gómez Gallardo, D., León Sánchez, R., Canales Aguirre, A., & Feria Velasco, A. (2014). Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genetics and Molecular Biology*, 37(1), 105-110.
- Ambreen, F., & Javed, M. (2018). Pesticide mixture induced DNA damage in peripheral blood erythrocytes of freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(1).
- Anand, S. S., Bruckner, J. V., Haines, W. T., Muralidhara, S., Fisher, J. W., & Padilla, S. (2006). Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(2), 156-166.
- Angerer, J., Ewers, U., & Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of the art. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(3), 201-228.
- Anonim, (2019). (ÇASGEM) Çalışma ve Sosyal Güvenlik Eğitim ve Araştırma Merkezi - TARIMDA İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ". <http://www.casgem.gov.tr/tr/detay/tarimda-is-sagligi-ve-guvenligi> - (Erişim Tarihi: 03 Temmuz 2019).

- Aplan, P. D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends in Genetics*, 22(1), 46-55.
- Atamanalp, M., & Cengiz, M., (2002). Bir sentetik piretroit insektisit (Cypermethrin)'in sublethal dozlarının *Capoeta capoeta capoeta* (Güldenstaedt, 1772)'da hemoglobin, hematokrit ve sediment seviyeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 19 (1-2), 169 –175.
- Aydin, B. (2011). Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 165-171.
- Baeza-Squiban, A., Marano, F., Ronot, X., Adolphe, M., & Puisieux-Dao, S. (1987). Effects of deltamethrin and its commercial formulation DECIS on different cell types in vitro: Cytotoxicity, cellular binding, and intracellular localization. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28(1), 103-113.
- Bajpayee, M., Pandey, A. K., Zaidi, S., Musarrat, J., Parmar, D., Mathur, N., & Dhawan, A. (2006). DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(9), 682-692.
- Banerjee, B. D., Koner, B. C., & Ray, A. (1996). Immunotoxicity of pesticides: perspectives and trends. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34(8), 723-733.
- Banerjee, B. D., Pasha, S. T., Hussain, Q. Z., Koner, B. C., & Ray, A. (1998). A comparative evaluation of immunotoxicity of malathion after subchronic exposure in experimental animals. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36(3), 273-282.
- Banerjee, B. D., Seth, V., & Ahmed, R. S. (2011). Pesticide-induced oxidative stress: Perspective and trends. *Reviews on Environmental Health*, 16(1), 1–40.
- Banerjee, B. D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S. T., & Chakraborty, A. K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107(1), 33-47.
- Barlow, S. M., Sullivan, F. M., & Lines, J. (2001). Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 407-422.
- Bartek, J., Falck, J., & Lukas, J. (2001). Chk2 kinase - a busy messenger. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(12), 877-886.
- Barthel, E. (1981). Increased risk of lung cancer in pesticide-exposed male agricultural workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 8(5-6), 1027-1040.
- Barthwal, M. K., Srivastava, N., Shukla, R., Nag, D., Seth, P. K., Srimal, R. C., & Dikshit, M. (1999). Polymorphonuclear leukocyte nitrite content and antioxidant enzymes in Parkinson's disease patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, 100(5), 300-304.

- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78-87
- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk factors for acute leukemia in children: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 138-145.
- Bhanu, S., Archana, S., Ajay, K., Singh, S., & Vandana, B. (2011). Impact of deltamethrin on environment use as an insecticide and its bacterial degradation - A Preliminary Study. *International Journal of Environmental Sciences* 1(10), 977-985.
- Bhunya, S. P., & Pati, P. C. (1990). Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis*, 5(3), 229-232.
- Biondi, A., Zappala, L., Stark, J. D., & Desneux, N. (2013). Do biopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and its biocontrol services through sublethal effects? *Plos One*, 8(9), e76548.
- Bolognesi, C., Carrasquilla, G., Volpi, S., Solomon, K. R., & Marshall, E. J. P. (2009). Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: Association to occupational exposure to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(15-16), 986-997.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272.
- Bonner, M. R., Freeman, L. E. B., Hoppin, J. A., Koutros, S., Sandler, D. P., Lynch, C. F., & Alavanja, M. C.R. (2017). Occupational exposure to pesticides and the incidence of lung cancer in the agricultural health study. *Environmental Health Perspectives*, 125(4), 544-551.
- Brendler-Schwaab, S. (1996a). YRC 2894-mutagenicity study for the detection of induced forward mutations in the V79/HPRT assay in vitro. Unpublished report No. 25163, edition No. M-000799-01-1, Bayer AG, Wuppertal, Germany.
- Brendler-Schwaab, S. (1996b). YRC 2894-test on unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures in vitro. Unpublished report No. 25429, Edition No. M-000790-01-1, Bayer AG, Wuppertal, Germany
- Brito, I. P., Tropaldi, L., Carbonari, C. A., & Velini, E. D. (2018). Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Management Science*, 74(5), 1064-1070.
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A. R., & Battershill, J. M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: A review. *Mutagenesis*, 21(2), 93-103.
- Cabral, J. R. P., Galendo, D., Laval, M., & Lyandrat, N. (1990). Carcinogenicity studies with Deltamethrin in mice and rats. *Cancer Letters*, 49(2), 147-152.
- Çakır, Ş., & Yamanel, Ş., (2005). Böceklerde insektisitlere direnç. Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, 6 (1), 21-29.

- Calderón-Segura, M. E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Martínez-Valenzuela, C., Carbajal-López, Y., Calderón-Ezquerro, M. del C., & Bañuelos-Ruíz, E. (2012). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *Journal of Toxicology*.
- Carmichael, S. L., Yang, W., Roberts, E., Kegley, S. E., Padula, A. M., English, P. B., & Shaw, G. M. (2014). Residential agricultural pesticide exposures and risk of selected congenital heart defects among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Environmental Research*, 135, 133-138.
- Carolan, K., Helps, J., Van den Berg, F., Bain, R., Paveley, N., & Van den Bosch, F. (2017). Extending the durability of cultivar resistance by limiting epidemic growth rates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1863), 20170828.
- Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., Yılmaz, D., & Coşkun, M. (2012). *In vitro* genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and γ H2AX foci assays. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3), 212-217.
- Černigoj, U., Štangar, U. L., & Trebše, P. (2007). Degradation of neonicotinoid insecticides by different advanced oxidation processes and studying the effect of ozone on TiO₂ photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 75(3), 229-238.
- Chargui, I., Grissa, I., Bensassi, F., Hrira, M. Y., Haouem, S., Haouas, Z., & Bencheikh, H. (2012). Oxidative stress, biochemical and histopathological alterations in the liver and kidney of female rats exposed to low doses of deltamethrin (DM): A molecular assessment. *Biomedical and Environmental Sciences*, 25(6), 672-683.
- Chauhan, L. K. S., Agarwal, D. K., & Sundararaman, V. (1997). In vivo induction of sister chromatid exchange in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyano pyrethroids. *Toxicology Letters*, 93(2), 153-157.
- Chauhan, Lalit K. S., Kumar, M., Paul, B. N., Goel, S. K., & Gupta, S. K. (2007). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or isoproturon on human peripheral lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(8), 636-643.
- Chinn, K., & Narahashi, T. (1986). Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *The Journal of Physiology*, 380(1), 191-207.
- Cohn, M. A., & D'Andrea, A. D. (2008). Chromatin recruitment of DNA repair proteins: Lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways. *Molecular Cell*, 32(3), 306-312.
- Cole, L. M., Ruzo, L. O., Wood, E. J., & Casida, J. E. (1982) Pyrethroid metabolism: comparative fate in rats of tralomethrin, tralocythrin, deltamethrin, and (1R, alpha S)-cis-cypermethrin. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 30, 631-636.

- Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238), 591-596.
- Corvi, R., Madia, F., Worth, A., & Whelan, M., Institute for health and consumer protection. (2013). EURL ECVAM strategy to avoid and reduce animal use in genotoxicity testing. <https://core.ac.uk/download/pdf/38626863.pdf> - (Erişim Tarihi: 23 Ağustos 2018).
- Cutler, G. C., Ramanaidu, K., Astatkie, T., & Isman, M. B. (2009). Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin. *Pest Management Science*, 65, 205–209.
- Damalas, C., & Koutroubas, S. (2016). Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. *Toxics*, 4(1), 10 pages.
- Denholm, I., Devine, G., Foster, S., Gorman, K., & Nauen, R. (2002). Incidence and management of insecticide resistance to neonicotinoids. *In Proceedings of an International Conference Crop Protection Conference: Pests and Diseases*, 1, 161–168.
- Descotes, J. (2000). Integrating immunotoxicity with effects on other biological systems in preclinical safety evaluation: a perspective. *Toxicology*, 142(3), 157-160.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomology*, 52, 81–106.
- Dhanasekaran, D. N., & Reddy, E. P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245-6251.
- Dickel, F., Munch, D., Amdam, G. V., Mappes, J., & Freitak, D. (2018). Increased survival of honeybees in the laboratory after simultaneous exposure to low doses of pesticides and bacteria. *Plos One*, 13(1), e0191256.
- Dolara, P., Salvadori, M., Capobianco, T., & Torricelli, F. (1992). Sister-chromatid exchanges in human lymphocytes induced by dimethoate, omethoate, deltamethrin, benomyl and their mixture. *Mutation Research Letters*, 283(2), 113-118.
- Drážovská, M., Šiviková, K., Dianovský, J., Holečková, B., & Galdíková, M. (2013). Use of sister chromatid exchanges and comet assay in genetic risk assessment. *Animal Welfare. Ethology and Housing Systems*, 9(3), 2, 427-432.
- Duke, S. O. (2014). Hormesis with pesticides. *Pest Management Science*, 70, 689.
- Dzwonkowska, A., & Hübner, H. (1986). Induction of chromosomal aberrations in the syrian hamster by insecticides tested in vivo. *Archives of Toxicology*, 58(3), 152-156.
- Easton, A. H., & Goulson, D. (2013). The neonicotinoid insecticide imidacloprid repels pollinating flies and beetles at field-realistic concentrations. *Plos One*, 8(1), e54819.

- Ecobichon, D. J. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, 160(1-3), 27-33.
- El-Gohary, M., Awara, W. M., Nassar, S., & Hawas, S. (1999). Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*, 132(1), 1-8.
- Elliott, M. (1980). Established pyrethroid insecticides. *Pesticide Science*, 11(2), 119-128.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Emden, H. F. V., & Peakall, D. B. (1996). Beyond silent spring: integrated pest management and chemical safety. Chapman & Hall, London, England, 322s.
- Enan, E., Pinkerton, K. E., Peake, J., & Matsumura, F. (1996). Deltamethrin-induced thymus atrophy in male Balb/c mice. *Biochemical Pharmacology*, 51(4), 447-454.
- EPA, Environmental Protection Agency (2005). "Summary of toxicology data thiacloprid". <http://www.cdpr.ca.gov/docs/risk/toxsums/pdfs/5888.pdf>.- (Erişim Tarihi: 10 Aralık 2014).
- EPA, Environmental Protection Agency. (2016). <https://www.epa.gov/pesticide-reevaluation/registration-review-process>- (Erişim Tarihi: 15 Ocak 2017).
- Eriksson, P., & Fredriksson, A. (1991). Neurotoxic effects of two different pyrethroids, bioallethrin and deltamethrin, on immature and adult mice: Changes in behavioral and muscarinic receptor variables. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(1), 78-85.
- Evenson, R. E., & Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science*, 300(5620), 758-762.
- Everett, C. J., Medunjanin, D., & Frithsen, I. L. (2018). Chapter 5 - Roles of environmental pollution and pesticides in diabetes and obesity: The epidemiological evidence. İçinde D. Bagchi & S. Nair (Ed.), *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome* (Second Edition), Academic Press, USA, 53-64 p.
- FAO, (2010). "Fao Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides, Thiacloprid". http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Thiacloprid_2010.pdf-(Erişim tarihi: 13 Ağustos 2018).
- Farah, M. A., Ateeq, B., & Ahmad, W. (2006). Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Science of The Total Environment*, 364(1), 200-214.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., & Zeng, E. Y. (2005). Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 239-246.

- Firat, Ö., & Aytekin, T. (2018). Neonikotinoid insektisit thiamethoxamın *Oreochromis niloticus*'ta oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 224-234.
- Figueroa González, G., & Pérez Plasencia, C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. *Oncology letters*, 13(6), 3982-3988.
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.-K., Greggers, U., Grünewald, B., & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees. *Plos One*, 9(3), e91364.
- Forkuoh, F., Boadi, N. O., Borquaye, L. S., & Afful, S. (2018). Risk of human dietary exposure to organochlorine pesticide residues in fruits from Ghana. *Scientific Reports*, 8(1), 16686.
- Forshaw, P. J., & Bradbury, J. E. (1983). Pharmacological effects of pyrethroids on the cardiovascular system of the rat. *European Journal of Pharmacology*, 91(2), 207-213.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., & Wood, R. D. (2005). DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology Press, USA, 1118s.
- Galdíková, M., Šivíková, K., Holečková, B., Dianovský, J., Drážovská, M., & Schwarzbacherová, V. (2015). The effect of thiacloprid formulation on DNA/chromosome damage and changes in GST activity in bovine peripheral lymphocytes. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(10), 698-707.
- Gandhi, G., Chowdhury, J. B., Sareen, P. K., & Dhillon, V. P. S. (1995). Genotoxic effects of deltamethrin in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutation Research Letters*, 346(4), 203-206
- Geske, F. J., Lieberman, R., Strange, R., & Gerschenson, L. E. (2001). Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death and Differentiation*, 8(2), 182-191.
- Ghisari, M., Long, M., Tabbo, A., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 284(3), 292-303.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818.
- Gómez-Arroyo, S., Calderón-Segura, M. E., & Villalobos-Pietrini, R. (1995). Sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by propoxur following plant activation by *Vicia faba*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26(4), 324-330.
- Gómez-Arroyo, S., Díaz-Sánchez, Y., Meneses-Pérez, M. A., Villalobos-Pietrini, R., & De León-Rodríguez, J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 466(1), 117-124.

- Gonzalez, M. C., Loria, D., & Matos, E. (1990). Genotoxicity of the pesticide propoxur and its nitroso derivative, NO-propoxur, on human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 232(1), 45-48.
- González-Mille, D. J., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., & Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. *Ecotoxicology*, 19(7), 1238-1248.
- Gordon, P. L., & Mcewen, F. L. (1984). Insecticide-stimulated reproduction of *Myzus persicae*, the green peach aphid (Homoptera, Aphididae). *The Canadian Entomologist*, 116, 783-784.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Gray, A. J. (1985). Pyrethroid structure-toxicity relationships in mammals. *Neurotoxicology*, 6(2), 127-37.
- Greaves, M. F., & Wiemels, J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 3(9), 639-649.
- Grisolia, C. K. (2002). A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 145-150
- Guanggang, X., Diqu, L., Jianzhong, Y., Jingmin, G., Huifeng, Z., Mingan, S., & Liming, T. (2013). Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 352-358.
- Gupta R. C. H. (2012) *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, Academic Press, USA, 1438, 81.
- Gupta, S., Gajbhiye, V. T., & Gupta, R. K. (2008). Effect of light on the degradation of two neonicotinoids viz acetamiprid and thiacloprid in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(2), 185-189.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490-491.
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: Ten years after. *Molecular Cell*, 28(5), 739-745.
- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 94(1), 135-155.
- Hayes, W. J., & Laws, E. R. (1990). *Handbook of pesticide toxicology classes of pesticides*, Academic Press, San Diego, USA, 18(3), 373-377.
- He, F., Deng, H., Ji, X., Zhang, Z., Sung, J., & Yao, P. (1991). Changes of nerve excitability and urinary deltamethrin in sprayers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 62(8), 587-590.

- Heinzow, B. G.; & McLean, A. (1994) Critical evaluation of current concepts in exposure assessment. *Clinical Chemistry*, 40(7), 1368–1375.
- Herbold, B. (1995a). YRC 2894- “In vitro mammalian chromosome aberration test with chinese hamster V79 cells”, Unpublished report No. 24516, edition No. M-000772-01-1, Bayer AG, Germany.
- Herbold, B. (1995b). YRC 2894– “Micronucleus test on the Mouse”, Unpublished report No. 24515, edition No. M-000775-01-1, Bayer AG, Germany.
- Hill, I. R. (1985) Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. In Leahey, J.P. ed. *The pyrethroid insecticides*, Taylor and Francis, London, UK, 151–262.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366.
- Hoellinger, H., Lecorsier, A., Sonnier, M., Leger, C., Do-cao-thang, & Nguyen-hoang-nam. (1987). Cytotoxicity, cytogenotoxicity and allergenicity tests on certain pyrethroids. *Drug and Chemical Toxicology*, 10(3-4), 291-310.
- Hong, Y., Yang, X., Huang, Y., Yan, G., & Cheng, Y. (2018). Oxidative stress and genotoxic effect of deltamethrin exposure on the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 212, 25-33.
- Hoy, J., & Swanson, N. (2015). The high cost of pesticides: Human and animal diseases. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 3(1), 132.
- Hsu, S. S., Chou, C. T., Liao, W. C., Liang, W. Z., Kuo, C. C., Chen, H., Chen, Y. T., Liu, S. Y., & Jan, C. R. (2012). Deltamethrin-induced $[Ca^{2+}]$ rise and death in HGB human glioblastoma cells. *The Chinese Journal of Physiology*, 55(4), 294-304.
- Husain, R., Malaviya, M., Seth, P. K., & Husain, R. (1994). Effect of deltamethrin on regional brain polyamines and behaviour in young rats. *Pharmacology & Toxicology*, 74(6), 211-215.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), (1990). Environmental Health Criteria 97, Deltamethrin. World Health Organization, Geneva.
- Issam, C., Samir, H., Zohra, H., Monia, Z., & Hassen, B. C. (2009). Toxic responses to deltamethrin (DM) low doses on gonads, sex hormones and lipoperoxidation in male rats following subcutaneous treatments. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(6), 663-670.
- IUPAC, (2006). "Glossary of Terms Relating to Pesticides". *Pure Applied Chemistry*, 78(11), 2075–2154.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.
- Jeschke, P., Nauen, R., Gutbrod, O., Beck, M. E., Matthiesen, S., & Haas, M. (2015). Flupyradifurone (Sivanto (TM)) and its novel butenolide pharmacophore: Structural considerations. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 31–38.

- Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64(11), 1084-1098.
- Kalliora, C., Mamoulakis, C., Vasilopoulos, E., Stamatiades, G. A., Kalafati, L., Barouni, R., & Tsatsakis, A. (2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 346, 58-75.
- Karabay, N. U., & Oguz, M. G. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 4, 653–662.
- Kavlock, R., Chernoff, N., Baron, R., Linder, R., Rogers, E., Carver, B., & Simmon, V. (1979). Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 2(3), 751-765.
- Keil, A. P., Daniels, J. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case–control study. *Environmental Health*, 13(1), 3.
- Kennedy, R. D., & D’Andrea, A. D. (2006). DNA repair pathways in clinical practice: Lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, 24(23), 3799-3808.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247-254.
- Kim, A. S., Eastmond, D. A., & Preston, R. J. (2006). Childhood acute lymphocytic leukemia and perspectives on risk assessment of early-life stage exposures. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 613(2), 138-160.
- Kisim, A., & Uzunoglu, S. (2012). HORMESIS: Antecedent phenomena for adaptation to low doses of toxic agents. *Turkish Journal of Forensic Medicine*, 26(3), 180-190.
- Ko, J., Park, J. H., Park, Y. S., & Koh, H. C. (2016). PPAR- γ activation attenuates deltamethrin-induced apoptosis by regulating cytosolic PINK1 and inhibiting mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 260, 8-17.
- Kocaman, A. Y., & Topaktaş, M. (2007). In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(6), 483-490.
- Kocaman, A. Y., & Topaktaş, M. (2010). Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and α -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 25(2), 157-168.
- Kocaman, A. Y., Rencüzoğulları, E., & Topaktaş, M. (2014). In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 29(6), 631-641.

- Kocaman, Y.A., (2007). Acetamiprid ve Alpha-Cypermethrin pestisidlerinin tekbaşına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferallenfositlerindeki in vitro genotoksik etkileri Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 207 s.
- Koller, V. J., Fürhacker, M., Nersesyan, A., Mišík, M., Eisenbauer, M., & Knasmueller, S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86(5), 805-813.
- Kovganko, N. V., & Kashkan, Zh. N. (2004). Advances in the synthesis of neonicotinoids. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 40(12), 1709-1726.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., & Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 193-201.
- Kumar, A., Sasmal, D. & Sharma, N., (2014). Deltamethrin induced an apoptogenic signalling pathway in murine thymocytes: exploring the molecular mechanism. *Journal of Applied Toxicology*, 34(12), 1303-1310.
- Kumar, A., Sasmal, D., & Sharma, N. (2018). Mechanism of deltamethrin induced thymic and splenic toxicity in mice and its protection by piperine and curcumin: in vivo study. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(1), 33-41.
- LaFiura, K. M., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., Ostrea, E. M., Matherly, L. H., Taub, J. W., & Ge, Y. (2007). Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T (8;21). *Pediatric Blood & Cancer*, 49(5), 624-628.
- Lemarié, S., & Marcoul, P. (2018). Coordination and information sharing about pest resistance. *Journal of Environmental Economics and Management*, 87, 135-149.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643.
- Li, D., Huang, Q., Lu, M., Zhang, L., Yang, Z., Zong, M., & Tao, L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere*, 135, 387-393.
- Lin, C.-M., Wei, L. Y., & Wang, T.-C. (2007). The delayed genotoxic effect of N-nitroso N-propoxur insecticide in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 45(6), 928-934.
- Lu, C., Zhu, F., Cho, Y.-Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W., Dong, Z. (2006). Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation, but Not for the Activation of Caspase-3. *Molecular Cell*, 23(1), 121-132.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. İçinde S. Sariaslani & G. M. Gadd (Ed.), *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29-92.
- Łukowicz-Ratajczak, J., & Krechniak, J. (1992). Effects of deltamethrin on the immune system in mice. *Environmental Research*, 59(2), 467-475.

- Ma, X., Buffler, P. A., Gunier, R. B., Dahl, G., Smith, M. T., Reinier, K., & Reynolds, P. (2002). Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environmental Health Perspectives*, 110(9), 955-960.
- Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., & Widmer, H. (2001). Chemistry and biology of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Management Science*, 57(10), 906-913.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., & Gorla, N. (2009). Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3), 834-837.
- Marková, E., Schultz, N., & Belyaev, D. I. Y. (2007). Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *International Journal of Radiation Biology*, 83(5), 319-329.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2013). Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 758(1), 41-47.
- Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderón-Segura, M. E., Félix-Gastélum, R., & Álvarez-Torres, A. (2009). Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*, 35(8), 1155-1159.
- Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., & Sattelle, D. B. (2009). Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: Structural insights. *Molecular Pharmacology*, 76(1), 1-10.
- Matsuda, K., Shimomura, M., Ihara, M., Akamatsu, M., & Sattelle, D. B. (2005). Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: Electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1442-1452.
- Mazmanci, B., Aşkin, A., & Tamer, L. (2008). Sıçanlarda Lambda Siyalotrinin Akut Toksik Etkisinin Araştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 15-19.
- Michelangeli, F., Robson, M. J., East, J. M., & Lee, A. G. (1990). The conformation of pyrethroids bound to lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1028(1), 49-57.
- Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth References and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65, 55.
- Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B. P. C., Chen, D. J., Chatterjee, A., & Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, 5(5), 575-590.

- Myers, M. A. (1998). Direct measurement of cell numbers in microtitre plate cultures using the fluorescent dye SYBR green I. *Journal of Immunological Methods*, 212(1), 99-103.
- Nakano, M., Omae, K., Takebayashi, T., Tanaka, S., & Koda, S. (2018). An epidemic of bladder cancer: Ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. *Journal of Occupational Health*, 60(4), 307-311.
- Narahashi, T., Frey, J. M., Ginsburg, K. S., & Roy, M. L. (1992). Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicology Letters*, 64-65, 429-436.
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M. E., Ebbinghaus-Kintscher, U., & Thielert, W. (2015). Flupyradifurone: A brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Management Science*, 71, 850–862.
- Noort, D., Van Zuylen, A., Fidder, A., Van Ommen, B., & Hulst, A. G. (2008). Protein Adduct Formation by Glucuronide Metabolites of Permethrin. *Chemical Research Toxicology*, 21(7), 1396-1406.
- Park, Y. S., Park, J. H., Ko, J., Shin, I. C., & Koh, H. C. (2017). mTOR inhibition by rapamycin protects against deltamethrin-induced apoptosis in PC12 Cells. *Environmental Toxicology*, 32(1), 109-121.
- Peña, A., Rodríguez-Liévana, J. A., & Mingorance, M. D. (2011). Persistence of two neonicotinoid insecticides in wastewater, and in aqueous solutions of surfactants and dissolved organic matter. *Chemosphere*, 84(4), 464-470.
- Phua, D. H., Lin, C. C., Wu, M.-L., Deng, J.-F., & Yang, C.-C. (2009). Neonicotinoid insecticides: an emerging cause of acute pesticide poisoning. *Clinical Toxicology*, 47(4), 336-341.
- Pingali, P. L. (2012). Green revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12302-12308.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68-102.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplnche, C., Marlina, G., Sanchez-Perez, J.M. & Pinelli, E. (2011). Mutagenic impact on fish of runoff events in agriculture areas in south-west France. *Aquatic Toxicology*, 101, 126-134.
- Poonam, S., Mysra, J., & Rambir, S. (2013); Deltamethrin toxicity: A review. *Indian Journal of Biological Studies & Research*, 2, 91-107.
- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 317-347.
- Prasad, S., Srivastava, S., Singh, M., & Shukla, Y. (2009). Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. *Journal of Toxicology*, 2009, 5 pages.
- Pui, C.-H., Relling, M. V., & Downing, J. R. (2004). Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 350(15), 1535-1548.

- Qi, Y., Toyooka, T., Kashiwagi, H., Yanagiba, Y., Koda, S., Ohta, H., & Wang, R. S. (2018). 2, 4-Dimethylaniline generates phosphorylated histone H2AX in human urothelial and hepatic cells through reactive oxygen species produced by cytochrome P450 2E1. *Archives of Toxicology*, 92(10), 3093-3101.
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(1), 51-62.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., & Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of h2ax histone at serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9390-9395.
- Rojas-García, A. E., Sordo, M., Vega, L., Quintanilla-Vega, B., Solis-Heredia, M., & Ostrosky-Wegman, P. (2009). The role of paraoxonase polymorphisms in the induction of micronucleus in paraoxon-treated human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(9), 823-829.
- Romero, A., Ramos, E., Castellano, V., Martínez, M. A., Ares, I., Martínez, M., & Anadón, A. (2012). Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 823-830.
- Ruzo, L. O., Unai, T., & Casida, J. E. (1978). Decamethrin metabolism in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 918-925.
- Sanders, L. H., Paul, K. C., Howlett, E. H., Lawal, H., Boppana, S., Bronstein, J. M., & Greenamyre, J. T. (2017). Editor's Highlight: Base Excision Repair Variants and Pesticide Exposure Increase Parkinson's Disease Risk. *Toxicological Sciences*, 158(1), 188-198.
- Saygı, Ş. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45 (3), 291-298.
- Schmuck, R. (2001). Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer, Germany*. 54(72), 161-184.
- Şekeroglu, V., Şekeroglu, Z. A., Kefelioğlu, H. (2011) Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thia-cloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 28(9), 524-531.
- Şekeroglu, V. (2010). "Thiacloprid ve deltamethrin insektisitlerinin tek başlarına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman sıçan kemik iliği hücrelerinde in vivo (rattus norvegicus berkenhout, 1769) genotoksik etkileri", Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Şekeroglu, V., Şekeroglu, Z. A., & Kefelioğlu, H. (2013). Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on wistar rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 28(9), 524-531.
- Şenyıldız, M., Kilinc, A., & Ozden, S. (2018). Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. *Toxicology and Industrial Health*, 34(6), 375-383.

- Shah, R. G., Lagueux, J., Kapur, S., Levallois, P., Ayotte, P., Tremblay, M., & Poirier, G. G. (1997). Determination of genotoxicity of the metabolites of the pesticides Guthion, Sencor, Lorox, Reglone, Daconil and Admire by ³²P-postlabeling. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 169(1), 177-184.
- Shukla, Y., & Taneja, P. (2000). Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent dominant lethal assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 119-127.
- Sial, M. U., Zhao, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Mao, L., & Jiang, H. (2018). Evaluation of Insecticides induced hormesis on the demographic parameters of *Myzus persicae* and expression changes of metabolic resistance detoxification genes. *Scientific Reports*, 8(1), 16601.
- Skovmand, O., & Sanogo, E. (2018). Resistance of *Culex quinquefasciatus* to selected chemical and biological pesticides. *Medical Research Archives*, 6(4).
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 77-96.
- Southam, C. M., & Ehrlich, J. (1943). Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33, 517-524.
- Spencer, E. Y. (1981). Guide to the chemicals used in crop protection", Edn 7, Publication 1093, Research Branch. Agriculture Canada, 58.
- Suárez-Larios, K., Salazar-Martínez, A.-M., & Montero-Montoya, R. (2017). Screening of pesticides with the potential of inducing dsb and successive recombinational repair. *Journal of Toxicology*.
- Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalán, J., Norppa, H., & Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 341(3), 169-184.
- Swanton, C. J., Mashhadi, H. R., Solomon, K. R., Afifi, M. M., & Duke, S. O. (2011). Similarities between the discovery and regulation of pharmaceuticals and pesticides: in support of a better understanding of the risks and benefits of each. *Pest Management Science*, 67(7), 790-797.
- Tabarean, I. V., & Narahashi, T. (1998). Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the type ii pyrethroid deltamethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(3), 958-965.
- Tang, Q., Ma, K., Chi, H., Hou, Y., & Gao, X. (2019). Transgenerational hormetic effects of sublethal dose of flupyradifurone on the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Plos One*, 14(1), e0208058.
- Tilman, D. (1998). The greening of the green revolution. *Nature*, 396(6708), 211.
- Timothy, C. M. (2012). Mammalian toxicology of insecticides. *Royal Society of Chemistry*, 12, 490.

- Tisch, M., Schmezer, P., Faulde, M., Groh, A., & Maier, H. (2002). Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 259(3), 150-153.
- Tisch, M., Faulde, M. K., & Maier, H. (2005). Genotoxic effects of pentachlorophenol, lindane, transfluthrin, cyfluthrin, and natural pyrethrum on human mucosal cells of the inferior and middle nasal conchae. *American Journal of Rhinology*, 19(2), 141-151.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 339-364.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247-268.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247-268.
- Tomizawa, M., Cowan, A., & Casida, J. E. (2001). Analgesic and toxic effects of neonicotinoid insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177(1), 77-83.
- Topè, A. M., & Rogers, P. F. (2009). Evaluation of protective effects of sulforaphane on DNA damage caused by exposure to low levels of pesticide mixture using comet assay. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44(7), 657-662.
- Tucker, E. S. (1994). III, "Consequences of immunodeficiency. In: Immunotoxicology and immunopharmacology". Edn 2, (Dean, J.H. et al. eds), Raven Press, New York, 1-18.
- Türkez, H., & Toğar, B. (2011). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(5), 531-537.
- Ündeğer, Ü., & Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*, 79(3), 169-176.
- Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), 196-206.
- Verschoyle, R. D., & Aldridge, W. N. (1980). Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 45(4), 325-329.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., & Delbac, F. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by nosema ceranae. *Plos One*, 6(6), e21550.

- Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini, G., Fatigoni, C., Marcarelli, M., & Rodríguez, A. V. (1998). In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology*, 130(2), 129-139.
- Vo, D. T., Hsu, W. H., Abu-Basha, E. A., & Martin, R. J. (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33(4), 315-322.
- Ward, I. M., Minn, K., Deursen, J. van, & Chen, J. (2003b). p53 Binding protein 53bp1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2556-2563.
- WHO- World Health Organization. (2006). Pesticide residues in food: Toxicological evaluations, sponsored jointly by FAO and WHO, with the support of the International Programme on Chemical Safety, joint meeting of the FAO Panel of Experts on 12 October 2006. Part 2, Toxicological. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43822>- (Erişim Tarihi: 02 Mayıs 2017).
- WHO-World Health Organization, (2016), www.who.int/topics/pesticides/en/ - (Erişim Tarihi 13 Haziran 2018).
- Williams, G. M., Mori, H., & McQueen, C. A. (1989). Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. *Mutation Research*, 221, 263–286.
- Williams, G. R., Troxler, A., Retschnig, G., Roth, K., Yañez, O., Shutler, D., & Gauthier, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports*, 5, 14621.
- Xie, H., Wise, S. S., Holmes, A. L., Xu, B., Wakeman, T. P., Pelsue, S. C., & Wise, J. P. (2005). Carcinogenic lead chromate induces DNA double-strand breaks in human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 586(2), 160-172.
- Yamamoto, I. (1999). Nicotine to nicotinoids: 1962 to 1997. *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, 3-27.
- Yang, W., Carmichael, S. L., Roberts, E. M., Kegley, S. E., Padula, A. M., English, P. B., & Shaw, G. M. (2014). Residential agricultural pesticide exposures and risk of neural tube defects and orofacial clefts among offspring in the San Joaquin Valley of California. *American Journal of Epidemiology*, 179(6), 740-748.
- Yoshimi, N., Sugie, S., Iwata, H., Niwa, K., Mori, H., Hashida, C., & Shimizu, H. (1988). The genotoxicity of a variety of aniline derivatives in a DNA repair test with primary cultured rat hepatocytes. *Mutation Research*, 206, 183–191.
- Zaller, J. G., & Brühl, C. A. (2019). Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 75.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., & Mortelmans, K. (1988). Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 11(12), 1–157.

- Zhang, A., Kaiser, H., Maienfisch, P., & Casida, J. E. (2000). Insect nicotinic acetylcholine receptor: Conserved neonicotinoid specificity of [3H] imidacloprid binding site. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1294-1303.
- Zhang, Z. W., Sun, J. X., Chen, S. Y., Wu, Y. Q., & He, F. S. (1991). Levels of exposure and biological monitoring of pyrethroids in spraymen. *Occupational and Environmental Medicine*, 48(2), 82-86.
- Zhao, Y.-J., Dai, Y.-J., Yu, C.-G., Luo, J., Xu, W.-P., Ni, J.-P., & Yuan, S. (2009). Hydroxylation of thiacloprid by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC1.1788. *Biodegradation*, 20(6), 761.
- Zhou, B.-B. S., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433.
- Zimmer, D., Mazurek, J., Petzold, G., & Bhuyan, B. K. (1980). Bacterial mutagenicity and mammalian cell DNA damage by several substituted anilines. *Mutation Research*, 77, 317-326.
- Zou, E., Hatakeyama, M., & Matsumura, F. (2002). Foci formation of MCF-7 cells as an in vitro screening method for estrogenic chemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(2), 71-77.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı BARBAROS ERTÜRK
Doğum Yeri MERZİFON / AMASYA
Doğum Tarihi 11.02.1971
Uyruğu T.C. Diğer:
Telefon 530 553 1069
E-Posta Adresi berturk@att.net



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fakülte Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı 25.06.1998

Yüksek Lisans

Üniversite Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı Biyoloji Anabilim Dalı
Programı Mikrobiyoloji
Mezuniyet Tarihi 27.09.2002

Doktora

Üniversite Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı Genel Biyoloji
Mezuniyet Tarihi 27.06.2019

Yayınlar

Erturk, H. Neval and Erturk, Barbaros (2008) Relationship between the leaf age and antioxidant enzyme activity. Conference Proceedings of Fourth Annual USC Upstate Research Symposium. pp. 45-48.,

Zerdeçalın kanser olan ve kanser olmayan meme bezi epiteli hücrelerinde Sitotoksik etkilerinin MTT testiyle araştırılması Eskişehir, Osman Gazi Üniversitesi, TÜRKİYE

Relationship between the Leaf Age and Antioxidant Enzyme Activity 4th Annual USC UPstate Research Symposium Spartanburg, SC, Amerika Birleşik Devletleri

CYP 450 gen ailesi: Dost mu yoksa düşman mı? Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Semineri

Bezelyede (*Pisum sativum* L.) Antioksidant Enzim Aktivitesi ve Yaprak Yaşı Arasındaki İlişkilerin Araştırılması 19. Ulusal Biyoloji Kongresi Karadeniz Teknik Üniversitesi TRABZON