

**HALFENPROX PESTİSİTİNİN MUTAJENİK AKTİVİTESİNİN
AMES TEST SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hatice EFECAN

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahmet SERTESER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mart, 2014

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HALFENPROX PESTİSİTİNİN MUTAJENİK AKTİVİTESİNİN
AMES TEST SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Hatice EFECAN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ahmet SERTESER

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

Mart, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Hatice EFECAN tarafından hazırlanan "Halfenprox pestisitinin mutajenik aktivitesinin AMES test sistemi ile belirlenmesi" adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 25/03/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet SERTESER



Başkan : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,



Üye : Doç. Dr. Ahmet SERTESER
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,



Üye : Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK
Afyon Kocatepe Üniversitesi Şuhut Meslek Yüksek Okulu



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

.....
Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

25/03/2014

Hatice EFECAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALFENPROX PESTİSİTİNİN MUTAJENİK AKTİVİTESİNİN AMES TEST SİSTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Hatice EFECAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet SERTESER

Bu çalışmada, tarım sektöründe oldukça yaygın olarak kullanılan Halfenprox pestisitinin mutajenik etkisi, kısa zamanlı bakteriyel mutajenite test sistemlerinden biri olan *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Çalışmada *Salmonella typhimurium*'un iki suşu olan TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bunun için her iki suş mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, Halfenprox'un 6,25µg/plak, 12,5µg/plak, 25µg/plak, 50µg/plak, 100µg/plak konsantrasyonlarında iki bağımsız paralel deneyde test edilmiştir. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA 98 için 4-nitro-o-fenilendiamine, S9 varlığında ise 2-aminofluorene, TA 100 için ise S9 yokluğunda Sodyum azid, varlığında ise 2-aminoanthracene kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise çözücü DMSO ve spontan kontrol grupları kullanılmıştır. Test sonuçları iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilmiş, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Dunnett-t testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; Halfenprox pestisiti TA 98 ve TA 100 suşlarının her ikisinde de herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir. Bu çalışma mutajenite çalışmalarında bir ön adım teşkil etmektedir, kesin sonuç alabilmek için araştırmanın diğer mutajenite test sistemleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

2014, viii +88 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ames test, mutajenite, Halfenprox, pestisit

ABSTRACT

M.Sc. Thesis.

DETERMINATION OF MUTAGENIC ACTIVITY OF HALFENPROX BY USING AMES TEST

Hatice EFECAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Sciences

Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Ahmet SERTESER

In this study, the mutagenic effect of Halfenprox used in agriculture widely have been investigated by using short-term bacterial mutagenicity test system namely *Salmonella*/microsome. In the *Salmonella*/microsome test system the mutant strains used are *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation. For this, 6,25µg/plate, 12,5µg/plate, 25µg/plate, 50µg/plate, 100µg/plate concentrations of Halfenprox were tested in two paralel independent experiments. At the absence of S9, 4-nitro-o-fenilendiamine, at the presence of S9, 2-aminofluorene was used as a positive control for TA 98. At the absence of S9 sodium azid, at the presence of S9 2-aminoanthracene was used as a positive control for TA 100. DMSO solution and spontaneous control groups were used as a negative control. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. The obtained data were statistically evaluated by Dunnett's t-test. Consequently; Halfenprox was not found mutagenic both TA 98 and TA 100 strains with or without S9. This study represents a first step in mutagenicity studies and need to support by other mutagenicity test methods in order to final results.

2014, viii + 88 pages

Key Words: Ames test, mutagenicity, Halfenprox, pesticide

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca iyi niyetiyle ve sabrıyla beni destekleyen, benden akademik desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet SERTESER'e teşekkür ederim.

Çalışmanın seçiminde fikirleriyle, laboratuvar çalışmalarım süresince yardımları ve bilgi birikimleriyle bana destek olan, tezimin tamamlanmasında büyük emek sarfeden, öneri ve fikirleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım Arş. Grv. Dr. Dilek AKYIL ve Yrd. Doç. Dr. Yasin EREN'e, çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşım İmren ÇALIK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında hertürlü derdime, sıkıntıma ortak olan ve manevi desteklerini hiç eksik etmeyen değerli hocalarım Arş. Grv. Dr. Arzu ÖZKARA ve Yrd. Doç. Dr. Feyza ERDOĞMUŞ'a çok teşekkür ederim.

Hayatın her aşamasında ve tüm çalışmam boyunca sıkıntı ve dertlerime ortak olup bana güvenerek her daim yanımda olan ve her konuda maddi manevi fedakarlık gösteren sevgili eşim Süleyman EFECAN'a ve çok değerli aileme sonsuz teşekkürler.

Hatice EFECAN

AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | vi |
| RESİMLER DİZİNİ | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | viii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2.LİTERATÜR BİLGİLERİ | 5 |
| 2.1 Mutasyon | 5 |
| 2.1.1 Kromozom Mutasyonları, Özellikleri ve Çeşitleri | 6 |
| 2.1.2 Gen Mutasyonlarının Özellikleri ve Çeşitleri | 10 |
| 2.2 Mutajenler | 13 |
| 2.3 Biyotransformasyon..... | 17 |
| 2.4 Mutajenlerin Saptanması İçin Geliştirilmiş Kısa Zamanlı Test sistemleri ve Ames Testi | 19 |
| 2.5 Ames/ <i>Salmonella</i> /Mikrozom Test Sistemi..... | 23 |
| Histidin Mutasyonu | 26 |
| Rfa Mutasyonu | 27 |
| uvrB Mutasyonu | 28 |
| R-faktörü..... | 28 |
| 2.6 Pestisitlerin Tanımı ve Tarihçesi..... | 29 |
| 2.7 Türkiyede Pestisit Kullanımı | 29 |
| 2.8 Pestisitlerin Sınıflandırılması | 32 |
| 2.8.1 Organofosforlu Pestisitler | 34 |
| 2.8.2 Organoklorlu Pestisitler..... | 34 |
| 2.8.3 Karbamat Grubu Pestisitler | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.8.4 Piretroid Grubu Pestisitler..... | 35 |
| 2.9 Pestisitlerin İnsanlar Üzerindeki Etkileri | 39 |
| 2.10 Pestisitlerin Çevreye ve Ekolojiye Etkileri | 41 |
| 2.11 Pestisitlere Bağlı Zehirlenmeler | 42 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 43 |
| 3.1 Materyal..... | 43 |
| 3.1.1 Kimyasal Maddeler | 43 |
| 3.1.2 <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları..... | 43 |
| 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı | 44 |
| 3.2 Metod..... | 55 |
| 3.2.1 Test Maddesinin Dozları ve Hazırlanışı..... | 55 |
| 3.2.2 <i>Salmonella</i> Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması | 55 |
| 3.2.3 <i>Salmonella</i> Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması..... | 55 |
| 3.2.4 Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi | 58 |
| 3.2.5 Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması..... | 59 |
| 3.2.6 S9 Karışımının Hazırlanması | 59 |
| 3.2.7 Ames Mutajenite Testinin Yapılışı | 59 |
| 4. BULGULAR..... | 62 |
| Genetik İşaretlerin Kontrolü | 62 |
| Kullanılan Test Maddesine Ait Bulgular | 65 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 69 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 88 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

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

Kısaltmalar

| | |
|------|--|
| ATP | Adenozin trifosfat |
| pH | Hidrojen potansiyeli |
| WHO | Dünya sağlık örgütü |
| EPA | Çevre koruma örgütü |
| ppm | Milyonda bir parça |
| CHO | Çin hamster ovaryum |
| HBA | Histidin/Biyotin/Ampisilin agar |
| MGA | Minimal glukoz agar |
| NB | Nutrient broth |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| IPCS | International Programme on Chemical Safety |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |

RESİMLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|--------------|
| Resim 4.1 <i>S. typhimurium</i> TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları | 63 |
| Resim 4.2 <i>S. typhimurium</i> TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları..... | 63 |
| Resim 4.3 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları..... | 63 |
| Resim 4.4 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının <i>uvrB</i> mutasyon kontrolü sonuçları..... | 64 |
| Resim 4.5 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları..... | 64 |
| Resim 4.6 <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları | 64 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Kimyasal mutajen/ kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları. | 21 |
| Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan <i>Salmonella</i> test suşlarının genotipik özellikleri.... | 25 |
| Çizelge 2.3. Bazı <i>Salmonella</i> test suşlarının DNA dizi özgüllükleri. | 26 |
| Çizelge 2.4. Türkiye’de Pestisit Tüketim Miktarı. | 31 |
| Çizelge 2.5. Pestisitlerin toksisite derecelerine göre sınıflandırılması | 33 |
| Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan pestisitinin genel özellikleri..... | 42 |
| Çizelge 4.1 Halfenproxun <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 suşları ile S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda plak inkorporasyon testi sonuçları . | 66 |

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışına paralel olarak teknoloji de hızla gelişmekte olup her geçen gün birçok alanda yeni gelişimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Teknolojideki gelişmeler, sağladığı faydaların yanında çoğu zaman çevre ve insan üzerinde olumsuz sonuçlara da yol açmaktadır. Son yıllarda artan nüfus ihtiyacının karşılanması amacıyla tarımsal alanda geliştirilen daha fazla ürün elde etme ihtiyacı tarımsal mücadelenin de artmasına neden olmuştur. Bu sebeple günümüzde tarımsal ilaç kullanımı her geçen gün yüksek etkinliğe sahip olduğu için daha fazla artış göstermiştir. Tarımsal mücadele amacıyla kullanılan pestisitler uygun dozda ve kullanılması gereken zamanda faydalı olurken bilinçsizce ve uygun olmayan dozda kullanımı çevre kirliliği nedeni olarak canlıları olumsuz etkilemektedir.

Terim olarak pestisit kısaca "pest" adı verilen zararlı canlıları öldürmek amacıyla kullanılan madde anlamına gelmektedir (Arıkan 2006). Genel anlamıyla pestisit insan kullanımına sunulan gıdalarda istenmeyen hayvan ve bitkileri öldürmek amacıyla kullanılan alet, metot veya kimyasal olarak tanımlanabilir. Pestisitler farklı şekillerde sınıflandırılmakla beraber en yaygın olarak kullanıldıkları zararlı grubuna göre, insektisitler, fungusitler, herbisitler, nematositler ve rodentisitler olarak gruplandırılmaktadırlar. Türkiye'de tarım ilaçları kullanımı, pestisitler yönüyle değerlendirildiğinde, en önemli grupların %45 insektisitler, %24 herbisitler, %16 fungusitlerin payı olduğu görülmektedir (Kaya 2007, Çakır 2008).

Milattan önce 7000 civarında insanlar bitkilerin ekim dönemlerinde haşereleri uzaklaştırmak veya değersiz bitkileri yok etmek için bazı metotlar geliştirmişlerdir. Bazı kültürler bunu ayın belirli dönemlerinde ekim yaparak denemişlerdir. Bazıları haşereleri elle veya gürültü yaparak bitkilerden uzaklaştırmayı seçmişlerdir. Bir kısmı da bu dönemde bazı kimyasalları kullanmaya başlamıştır. Ufalanmış taç yaprağı (bir çeşit krizantem), sülfür ve arsenik Orta Doğu, Roma ve Çin'de kullanılmaya başlarken, bu dönemlerde Çin istenmeyen haşaratları yemesi için karınca gibi doğal avcılarını kullanmayı da tercih etmiştir (İnt.Kyn.1).

İkinci Dünya Savaşı sonrası yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan sentetik kimyasal üretimi artış göstermiştir. İkinci Dünya Savaşı öncesi 30 çeşit pestisit bulunuyorken 1970 'den beri dünya genelinde piyasaya yaklaşık 28 milyon kg pestisit etken maddesi sunulmuştur. Bu da 900 aktif içerik ve 50000 ticari pestisit formülasyonunu kapsamaktadır (Pan American Health Organization 2002). Ziraî uygulamaların yanında pestisitlerin temizlik işlemlerinde, halk sağlığında, boyalarda, kağıt yapımında ve yüzme havuzu sularında kimyasal karışımlar olarak kullanıldığı bilinmektedir (Al-Saleh 1994, Muranlı 2006).

Aynı pestisitlerin geniş ölçüde ve yıllarca kullanımı birçok böcek populasyonunun bu kimyasallara karşı hassasiyetini yitirerek dirençli hale gelmesine neden olmuştur. Bu yüzden kullanılan insektisitlerin devamlı olarak yenilenmesi gerekmektedir. Bunun sonucunda organoklorin ve organofosforlu insektisitlerin uygulanması zamanla azalmış ve onlara alternatif olarak piretroidler, daha sonra da neonikotinoidler artan bir hızla kullanılmaya başlanmıştır (Kovganko and Kashkan 2004).

Modern tarımda bitki zararlılarını kontrol etmek amacı ile kullanılan pestisitlerin mitotik ve mayotik hücre bölünmelerini etkilediği, insanlarda, hayvanlarda ve ekonomik önemi olan bitkilerde genetik hasara neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. (Ribas *et al.* 1996, Agrawal *et al.* 1996, Chaunhan *et al.* 1998, Cicchetti *et al.* 1999, Soloneski *et al.* 2002, Zeljezic and Garaj-Vrhovac 2004, D'Souza *et al.* 2005, Chauhan and Gupta 2005).

Pestisit kullanımının fazla olduğu ülkelerde pestisit zehirlenmesinden kaynaklı ölümler diğer ölümlere oranla daha fazladır. Pestisitler zehirlenmenin yanında kalıcı rahatsızlıklara da neden olmaktadır. Pestisitlerin mesane kanseri (Viel and Chalier 1995), lösemi (Brown *et al.* 1990, Blair and Zahm 1995), pankreas kanseri (Ji *et al.* 2001), non-hodgkin's lenfoma (Waddel *et al.* 2001, Zheng *et al.* 2001, Chiu *et al.* 2004) ve parkinson (Jenner 2001) gibi kanser ve genetik hastalıklara yol açtığı bildirilmiştir. Pestisitlere maruz kalan anne babaların çocuklarında, doğuştan gelen bozukluk (teratojenik etki) riskinin arttığı bildirilmiştir (Garcia *et al.* 1998).

Son yıllarda artan kanser hastalıkları nedeniyle her geçen gün kullanımı artan kimyasalların kullanılmadan önce insan sağlığı ve çevre üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Bilim adamları bu konuda kısa zamanlı ve düşük maliyetli birçok test sistemi geliştirmişlerdir. Böylece kullanılacak olan kimyasalın mutajenik ve genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığı ve kullanılması gereken minimum doz miktarı, ürünler üzerinde ve toprakta bıraktığı kalıntı miktarı pestisit kullanılmadan önce kolaylıkla tespit edilebilmektedir.

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya koymak için en kalıcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman alan ve maliyeti yüksek olan testlerdir (IARC 1980). Bu nedenle araştırmacılar karsinojenite taramalarında temel olabilecek kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Maron and Ames 1983, Quillardet and Hofnung 1985, Hofnung and Quillardet 1986, Brockman *et al.* 1994, Barış 2007).

Kısa zamanlı test sistemlerinin en yaygın olarak kullanılanı bakteriyel testlerdir. Bakteriler, bu çalışmalarda basit üreme ortamlarında hızla üreyebildiklerinden, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından dolayı tercih edilmektedir (Venitt *et al.* 1986, Hofnung and Quillardet 1986, Akyıl 2006, Barış 2007).

Kısa zamanlı testler içerisinde en yaygın kullanılanı Ames testi olup, bu test sistemi, 1970'lerin başında Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı bir geri mutasyon testidir (Maron and Ames 1983). Ames/*Salmonella*/Mikrozom testi bakteriyel mutasyon testleri içinde mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve karakterize edilen, uygulama kolaylığı, geçerliliği ve hassaslığı nedeniyle en fazla tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gathouse *et al.* 1998). Bu yöntemde test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C ya da his D) gelişebilmek için histidine gereksinim duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür.

Bu çalışma da kullanılan Halfenprox pestisiti, sentetik piretroid pestisitler grubunda yer almaktadır ve tarımda sebze ve meyve, mist ve diğer böcekleri kontrol etmek için kullanılan bir insektisit ve akarisitdir. En çok elma kırmızı örümceğine karşı mücadelede kullanılmakta olup birçok insektisitle de karıştırılarak kullanılabilir (İnt.Kyn.2). Dünyada kullanılmakta olan insektisitlerin %30'unu sentetik piretroidler oluşturmaktadır ve hedef organizmaya karşı çok toksik, kuşlar ve memelilere karşı az toksik olmaları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedirler. Ancak bu pestisitler hedef organizmalar dışındaki canlılar üzerinde olumsuz etkilere de neden olabilmektedir. Sentetik piretroidler, toksik etkilerini memeliler veya böceklerin sodyum kanalları üzerinde göstererek, periferik merkezi sinir sistemlerindeki aksonları etkileyen sinir sistemi zehirleridir (Çalışkan 2010).

Bu çalışmanın amacını, zirai mücadelede sebze ve meyve mist ve diğer böcekleri kontrol etmek amacıyla insektisit ve akarisit olarak sıklıkla kullanılan Halfenprox pestisitinin kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden biri olan Ames/*Salmonella*/Mikrozom testi ile mutajenik etkilerini araştırmak oluşturmaktadır.

2.LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Mutasyon

Genetik kodun yer aldığı DNA’da kendiliğinden veya çeşitli etkenlere bağlı meydana gelen kalıtsal değişikliklere “mutasyon”, mutasyonu taşıyan bireye “mutant” ve mutasyona neden olan faktöre “mutajen” adı verilir (Yıldırım *et al.* 2007).

Mutasyon terimi ilk kez 1901 yılında, Hugo De Vries tarafından *Oenatra lamarckiana* (akşamsefası) ile yaptığı çaprazlamalarda gözlemediği varyasyonu tanımlamak için kullanmıştır (Klug and Cummings 2003).

Mutasyonlar ister genetik ister kromozomal olsun, herhangi bir kalıtsal değişiklik olarak belirlenir ve tüm genetik çeşitliliğin kaynağını oluşturur. Mutasyonların en önemli sonucu bir sonraki kuşağa farklı genetik özelliklerin aktarılmasını sağlamasıdır. Bu durum farklı fiziksel özelliklere sahip bireyler meydana getirir. Bu değişimler sonucu ortaya çıkan fenotipik çeşitlilik, genetikçilerin değişikliğe uğramış olan genleri çalışmalarına yardımcı olmaktır. Genetikçiler mutant genleri belirteç olarak kullanarak genlerin kromozom üzerindeki yerini belirleyebilmektedirler (Öner 2009).

Bakteriler, virüsler, mantarlar, bazı bitkiler, meyve sinekleri ve fareler genetik çalışmalarda model organizma olarak daha çok kullanılmaktadır. Ömürlerinin kısa olması, çok sayıda yavru verebilmeleri ve genetiklerinin karakterize edilip haritalanmış olması bu organizmaların genetik çalışmalarda daha çok tercih edilme sebebidir (Öner 2009).

Kalıtsal materyal üzerinde meydana gelen değişimler somatik hücrelerde ya da gamet hücrelerinde meydana gelebilir. Somatik hücrelerde meydana gelenler sadece o organizmayı etkilerken gamet hücrelerinde meydana gelenler nesilden nesile aktarılabildikleri için gelecek nesilleri de etkilerler (Bütüner ve Katrancı 2006).

Mutasyonlar genetik materyalde meydana getirdiği değişiklikler ve organizmanın protein yapısında ortaya çıkan değişimlerle neden oldukları zararlardan farklı olarak varyasyonunda temelidirler. Türlerin evrimine yol açan değişikliklerden sorumlu oldukları için mutasyonlar biyolojik olarak çok önemlidir (Aksoy 1998).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden oluşabildiği gibi, mutajen adı verilen kimyasal ya da fiziksel dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Genel olarak mutasyonun kendiliğinden oluşabilme ihtimalinin çok düşük olmasına karşın, mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansının oluşabilme ihtimali oldukça yüksektir. Normal koşullarda kendiliğinden olan mutasyon frekansı her jenerasyonda 10^{-5} - 10^{-10} gibi bir değerde olup çok daha düşüktür (Oraler 1990, Akyl 2006).

Sınıflama kolaylığı sağlamak amacıyla mutasyonlar kromozomların sayı veya yapılarındaki değişiklikler ile sitolojik olarak kromozom düzeyinde gözlenemeyen, ancak bireyin fenotipindeki farklılıkla saptanabilen gen mutasyonları olarak gruplandırılabilirler (Oraler 1990).

2.1.1 Kromozom Mutasyonları, Özellikleri ve Çeşitleri

Genetikçiler, mutasyonun neden olduğu iki farklı düzeyi belirlemişlerdir. Gen mutasyonunda, bir gen aleli değişerek farklı bir alel olabilir. Böyle bir değişim tek gen içinde olduğu için ve bir kromozomal lokusta haritalandığından gen mutasyonuna, nokta mutasyonu da denir. Soya çekimsel diğer değişim düzeyi kromozom mutasyonu olup, kromozom segmentleri, bütün kromozomların ve hatta kromozomun tüm takımının değişimi anlamında kullanılır. Diğer bir deyişle, kromozom mutasyonları, sayısal kromozom mutasyonları ya da yapısal kromozom mutasyonları olarak tanımlanabilir (Bozcuk 2005).

2.1.1.1 Kromozom Sayı Değişimleri

Kromozom sayı değişimleri kromozomlardan birinin veya birkaçının sayıca değişmesi yani bir kromozomun eksilmesi ya da bir veya daha fazla sayıda kromozom eklenmesi şeklinde olabilir (Sağlam 2000). Her canlının kendine özgü bir kromozom sayısı vardır ve bu sayı sabittir. Ancak bazı durumlarda türün bazı bireylerinde kromozom sayılarında sapmalar olabilmektedir. Kromozomlar bazen mayoz ve mitoz bölünme sırasında eşit olarak dağılmaz ve sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir. Kromozom sayı değişiklikleri başlıca iki grup altında toplanır. Bunlar; öploidi ve anöploidi (Yüksel 2005, Ateş 2011).

Öploidi

Kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Bir takımdaki kromozomların sayısının temel kromozom sayısının tam katları kadar ya da organizmada tek takım kromozom bulunması şeklinde olabilir. Bu değişimler monoploidi ve poliploidi. Nadiren bazı hayvan ve bitki hücreleri temel kromozom sayısı kadar yani "n" kromozom içerir. Bu duruma monoploidi, bu şekildeki ferde ise monoploid denir. Bir genomdaki kromozomların sayısının hepsinin birden artmasına da poliploidi denir. Poliploidi sonunda $3n$, $4n$, $5n$ ve daha yüksek katlarda n kromozomlu fertler meydana gelebilir. Poliploidiler iki yolla meydana gelebilirler mayozda kromozom sayısının yarıya inmesinin önlenmesi ile somatik hücrelerdeki kadar gametlerin oluşmasıyla ya da zigotun ilk bölünmesi sırasında enine çeperin oluşmasına engel olunması suretiyle meydana gelecek bireyin kromozom sayısı yükselebilir (Yüksel 2005).

Anöploidi

Kromozom takımında bulunan kromozomlardan birinin ya da birden fazlasının sayıca değişmesidir. Mayoz bölünme sırasında homolog kromozom çiftlerinden birinin bir

kutba diğzerinin de diğzer kutba gitmesi gerekirken bazen kromozom, homologundan ayrılmadan aynı kutba giderek aynı gamette yer alabilirler. Bu olaya non disjunction denilmektedir. Anöploidi monosomi, nullisomi ve polisomi olarak üçe ayrılmaktadır. Monosomi, diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksilmesidir. Nullisomi, bir canlıda bir kromozomun homologu ile birlikte eksilmesidir. Polisomi, bir veya birkaç kromozomun sayıca artmasıdır ve değışik şekilleri vardır. Trisomi, diploid bir bireyde bir kromozomun fazla bulunmasıdır. Tetrasomi ise diploid bir bireyde bir kromozomun iki misli fazla bulunmasıdır (Demirsoy 2003).

2.1.1.2 Kromozom Yapı Değışimleri

Kromozom yapı değışikliklerinin çoğı, genetik materyalin kaybı ya da yer değıştirmesi sonucu ortaya çıkan bir ya da daha fazla kromozom kırıklarından kaynaklanmaktadır. Kromozom yapı değışikliklerinde kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlar da bazı parçalar yer değıştirebilir, artabilir veya kaybolabilir. Kromozomlar kendiliğinden kırılabilir ancak kimyasallara ya da radyasyona maruz kalan hücrelerde kromozomların kırılma oranı daha yüksektir (Öner 2003).

Delesyon

Eksilme ya da delesyon bir kırılma sonucu, kromozomun küçük bir parçasının kopması demektir (Başaran 2003). Kırılmaya radyasyon, ısı, kimyasallar, virüsler gibi ajanlar neden olabilir. Delesyonda hücre genlerini kaybeder. Sentromeri olmayan kırık kromozom parçası bir sonraki bölünmede iğ ipliklerine tutunamayacağından çekirdek dışında kalıp yok olur. Eğıer hücre diploid ise kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz. Eğıer kaybedilen parça çok büyük olursa gen dengesi bozulacağından öldürücü olabilir. Erkeklerin Y kromozomunda meydana gelen böyle bir parça eksilmesi Y kromozomu üzerinde alleli olmadığından ölümle sonuçlanabilir (Demirsoy 1992).

Duplikasyon

Homolog iki kromozomlardan birinde çift darbe sonucu kopan parça, diğerinde tek darbe sonucu kopan aralığa girerek kaynaşması sonucu olur. Duplikasyon, bir kromozom parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrarlar görülmesi şeklindeki kromozom anomalisidir. Moleküler seviyedeki küçük bir dublikasyonun evrim açısından gen farklılaşmalarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Başaran 2003).

Mayoz bölünme sırasında bir eşit olmayan krosing over sonucu ortaya çıkar ve mayotik kromozomlardan birisinde dublikasyon varken diğerinde delesyon görülür. Dublikasyonlar delesyonlardan daha sık görülür fakat daha az zararlıdır (Başaran 2003).

Duplikasyonun üç değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon genin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlar da olduğu gibi duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir. Üçüncüsü, güvenilir bir teoriye göre, duplikasyonlar evrim sürecinde genetik çeşitliliğin önemli bir kaynağıdır (Öner 2003).

İnversiyon

İnversiyon, kromozomdan kopan parçanın koptuğu bölgeye 180° ters dönerek tekrar aynı yere yapışması sonucu ortaya çıkan mutasyon tipidir. İnversiyonun meydana geldiği gen bölgesi sentromer içeriyorsa bu olay perisentrik inversiyon, sentromer içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak adlandırılır. İnversiyon sonucu kromozomda taşınan gen sayısı aynı kaldığı halde; genlerin dizilişinde meydana gelen değişim fenotipik olguların ortaya çıkmasına sebep olur. Doğada en sık görülen kromozom mutasyonlarından biri olan inversiyonlar, çok yakın türler ve alt türler arasındaki melezlemelerde görülen bazı anormal sinaps oluşumu olgularının en temel sebebidir (Dayıoğlu ve Kuru 1997, Kuru ve Gözükara 2001, Sağgöz *et al.* 2001, Dilek 2004, Korkmaz 2005, Mumcu 2005, Öztaş 2005, Yüksel 2005, Barış 2007, Öner *et al.* 2009).

Translokasyon

Bir kromozomun bir parçasının kopup başka bir kromozomun kopan parçası ile yer değiştirmesidir.

İntrakromozomal (kromozom içi) translokasyonlar; aynı kromozomda ya bir kromozom kolundan diğer kola, ya da aynı kromozom kolu içinde bir kromozom parçasının yerinde olan değişikliği kapsar (Yıldırım *et al.* 2010).

İnterkromozomal (kromozomlar arası) translokasyonlar; basit translokasyon ve resiprokal translokasyon olmak üzere iki tipi vardır. Basit translokasyon, bir kromozomdan herhangi bir kromozom parçasının homolog olmayan bir kromozoma transferini kapsar. Resiprokal translokasyon ise iki homolog olmayan kromozomlardaki parçaların karşılıklı değişimini içerir (Yıldırım *et al.* 2010).

2.1.2 Gen Mutasyonlarının Özellikleri ve Çeşitleri

Bir genin genomdaki yeri ve sayısı değişmeden gen yapısının değişmesidir. Gen mutasyonlarında kromozom yapısında herhangi bir değişim olmaz, baz dizilimleri üzerinde değişimler olur (Demirsoy 2005).

Gen mutasyonları kendi içerisinde bir bazın yerine başka bir bazın geçmesi ile karakterize edilen baz değişimi olan “nokta mutasyonları”, genetik materyale bir veya birden fazla bazın katılması ile oluşan “inversiyonlar” ve bunun tersi olarak bir veya birden fazla bazın çıkması olan “delesyonlar” olarak 3 temel grup altında toplanmaktadır. Bu noktada yapılan daha ileri düzeydeki sınıflandırmalarda baz değişimi nokta mutasyonlarını da kendi içerisinde bir pirimidin bazının yerini bir pirimidin veya bir pürin bazının yerini bir pürin bazının aldığı **transisyonlar** (A→G, G→A, C→T, T→C) ve bir pirimidin bazının yerini bir pürin ya da pürin bazının yerini bir pirimidin bazının aldığı **transversiyonlar** (A→C, A→T, G→C, G→T, C→A, C→G, T→A,

T→G) olarak iki alt gruba ayırmak mümkündür (Kuru ve Gözükara 2001, Bahçeci 2007, Brown 2007, Öner *et al.* 2009).

Baz çifti mutasyonları organizma genomunun herhangi bir yerinde oluşabilir. Gen mutasyonları organizma genomunun anlamlı ya da kontrol bölgelerinde meydana gelmedikçe baz çifti mutasyonları belli bir fenotipik etkiye neden olmaz. Bu mutasyonda önemli olan genleri etkileyen mutasyonlardır. Bunun sonucunda hücresel fonksiyon, proteinlerin bir sonucu olduğu için protein kodlayan genlerin ekspresyonunu etkileyen mutasyonlara daha fazla ilgi duyulmuştur.

Gen mutasyonları hem somatik, hem de gametlerde veya gamet ana hücrelerinde meydana gelebilir. Fakat somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar, eşeyli üreme ile çoğalan canlılarda yeni döllere aktarılmaz. Prokaryotlar da ise vücut hücresi-eşey hücresi gibi bir ayırım olmadığından bütün mutasyonlar yeni oluşan nesillere aktarılırlar. Mutasyonla genellikle dominant genler resesif hale geçerler. Çok nadir olarak, mutasyonla oluşmuş olan resesif bir gen, başka bir mutasyonla tekrar kendisini veren dominant gene dönebilir. Bu olaya ters mutasyon veya geri mutasyon adı verilir. Geri mutasyonun meydana gelme olasılığı, mutanti oluşturan ileri mutasyonun olasılığından daha düşüktür (Bilge 1981, Oraler 1990).

Gen mutasyonları, mutajenlerin etkisiyle ya da kendiliğinden meydana gelebilir. Mutajenler gen mutasyonlarının meydana geliş frekansını yükseltir (Oraler 1990).

Genetik şifre triplet diye adlandırılan üçlü nükleotid gruplarından meydana geldiği ve her triplette bir aminoasit kodladığından (sonlanma kodonları hariç), gen dizelerinde oluşan herhangi bir değişiklik şifrelenen bilgiyi bozabilmektedir. Şifrede değişikliklere neden olan çeşitli tipte gen mutasyonları vardır (Zemheri 2011).

Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

DNA'daki bazlara üç ve üçün katları olmayan sayıda inversiyon ya da delesyonlar sonucunda tripletlerin değişmesine yol açan mutasyonlara çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları adı verilir. Bu tip mutasyonlar eklenen/eksilen baz sayısına ve insersiyon/delesyon pozisyonuna bağlı olarak son derece dramatik sonuçlar doğurabilir (Yıldırım *et al.* 2007).

Baz Değişim Mutasyonları

Bir gen bölgesinde bir bazın farklı bir bazla yer değiştirmesiyle oluşan mutasyonlardır. Baz değişim mutasyonları nokta mutasyonları olarak da adlandırılır. Bu tip mutasyonlarda bazların değişimi transisyon (karşılıklı geçiş) veya transversiyon (çapraz geçiş) mutasyonu olarak iki şekilde gerçekleşir (Zemheri 2011).

Sessiz, Yanlış Anlamli ve Anlamsız Mutasyonlar

DNA bazlarında meydana gelen her türlü değişiklik mutasyon olarak kabul görse de, görünür bir fenotipik etkisi olmayan mutasyonlar da mevcuttur. Bu tür mutasyonlar gen ürününün aktivitesini ve yapısını değiştirmedikleri için sessiz (silent) mutasyon olarak adlandırılır. Örneğin, UAC tripletinin UAU'ya dönüşmesi gerçek anlamda bir nokta mutasyonu olmasına rağmen her iki triplette de aynı aminoasidi (tirozin) kodladığından genin protein ürününde bir değişim görülmez. Sessiz mutasyon oluşumu genetik şifrenin dejenere özelliğinden, yani tripletlerin ilk iki bazı son derece spesifik iken üçüncü bazlardaki farklılığın tolere edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, baz değişikliğinin intron adı verilen ve genin fonksiyonu üzerinde etkisi olmayan bölgede meydana gelmesi de yine sessiz mutasyona sebep olur. Sessiz mutasyonların varlığı ancak ilgili genin baz dizisinin belirlenmesiyle anlaşılabilir. Tripletlerin anlamlarının değişmesine ve protein yapısına başka bir aminoasit katılmasına neden olan nokta mutasyonlarına yanlış anlamli (missense) mutasyon denir. Örneğin, bu tip mutasyonla

tirozini kodlayan UAU tripleti, serini kodlayan UCU tripletine dönüşebilir. Bazen de gen mutasyonları hiçbir aminoasiti şifrelemeyip, dur anlamını ifade eden tripletlere (UAA, UAG, UGA) dönüşmesine neden olabilmektedir. Bu tip mutasyonlara da anlamsız (nonsense) mutasyon denir. Anlamsız mutasyon bir gen dizisinin özellikle başlangıç ve orta kısmının üretilmesine neden olur ve bu durumdaki bir proteinin işlevini yerine getirememesi olasılığı son derece yüksektir. (Yıldırım *et al.* 2007, Zemheri 2011, Çetiner 2012).

2.2 Mutajenler

Genetik kodun yer aldığı DNA'da kendiliğinden veya çeşitli etkenlerle meydana gelen kalıtsal değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonlara sebep olan fiziksel ve kimyasal gibi çevresel etmenlere de mutajen adı verilir. Bir dış etkenin mutajen olabilmesi için hücre içine girip etkinlik göstermesi gerekmektedir. Örneğin, güneşin morötesi ışınları düşük enerjili oldukları için sadece deri hücrelerinde somatik mutasyonlara neden olurken, yüksek enerjili X ışınları germ hücrelerinde mutasyona neden olarak nesilden nesile aktarılan mutasyonlar oluştururlar. Mutasyonlar ayrıca hücre bölünmesi üzerindeki kontrol mekanizmasını çıkararak kontrolsüz hücre bölünmesine ve dolayısıyla da kansere neden olabilirler (Ateş 2011).

Mutajen kimyasal maddeler arasında, böcek öldürücü, ot öldürücü ilaçlar gibi tarım ilaçları başta gelmektedir. Bununla birlikte kurutulmuş gıda ve içeceklerdeki koruyucular ve temizlikte kullanılan bazı ilaçlar da örnek olarak verilebilir. Sigara dumanındaki ve hava kirliliğinden kaynaklanan kimyasal madde ve gazlar, birinci dereceden mutajen ajanlardır (İnt.Kyn.3) .

Genellikle kabul edilir bir görüşe göre, karsinojenik etki gösteren tüm maddeler doğrudan veya metabolize edildikten sonra aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri yani mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun aksi, yani tüm mutajenik maddelerin karsinojenik etki göstermeleri ise bazı durumlarda gerçekleşmemektedir.

Bunun nedeni, kanserin çok basamaklı karmaşık bir biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkabilmesine rağmen mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkması olabilir (Bağcı 1985).

Mc Cann vd. (1975a, 1976) karsinojen olan ve olmayan 300 kimyasalı, *Salmonella*/Mikrozom test sistemi ile taradıklarında 175 karsinojen maddenin 157 tanesinin mutajenik etkili, karsinojenik etki göstermeyen 108 maddenin 94 tanesinin mutajenik etkili olmadığı saptamışlardır. Mutasyon oluşturabilen etkenler; fiziksel, biyolojik ve kimyasal olarak üç grupta sınıflandırılabilir.

Fiziksel Mutajenler

Manyetik, sıcaklık ve elektriksel alan, proton, nötron ışınları, UV (ultraviyole), pH gibi etkenlerdir. Fiziksel mutajenler etki şiddetine ve süresine göre geçici veya kalıcı değişimlere yol açarlar (Erkan 1992).

Yüksek enerjili ışınların canlılarda başta kanser olmak üzere birçok sağlık sorununa neden olduğu kanıtlanmaktadır. Söz konusu yüksek enerjili ışınlardan özellikle iyonlaştırıcı olanların, son derece güçlü mutajenik etkilerinin de olduğu anlaşılmıştır. X ve Y ışınları gibi iyonlaştırıcı ışınlar kuvvetli fiziksel mutajenlerdir. Canlı dokularına nüfuz etme yeteneğine sahip oldukları için tıbbi teşhiste kullanılırlar. Bazlar arasında dimer oluşumuna ve bazların halka yapılarının bozulmasına neden olabilirler. Yapısı bozulan bazlar karşısına gelen baz ile bağ oluşturamadığı için iplik ya da kromozom kırılmasına yol açarlar. İyonlaştırıcı olmayan UV ışınları da kuvvetli bir mutajendir. UV ışınları çarptığı atomlara enerji vermesi ve elektronları yüksek enerji seviyesine çıkarması sonucu mutasyonlara neden olurlar. Pürin ve pirimidin bazları UV ışınlarını emerek reaktif duruma geçebilirler. UV'nin DNA tarafından emilmesi sonucu pirimidin dimerleri oluşur sonuçta DNA çift sarmal yapısı bozulur ve bu durum replikasyonunda etkiler (Tüylü *et al.* 2009).

Yüksek sıcaklık moleküllerin kinetik enerjilerini artırmak suretiyle mutasyonlara sebep olur. Moleküllerin hızla hareket ederek birbirleriyle çarpıştıkları bir ortamda moleküler kazalar veya yanlışlıkların meydana gelme olasılığı artar (Kuru 2005).

Biyolojik mutajenler:

Biyolojik mutajenler olarak yer değiştirebilen genetik elementler (mobil elementler) (Transposable elementler) ve virüsler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrenin DNA'sına girdiğinde, ayrılırken beraberinde konak DNA'sının bir parçasını da götürerek veya kendi DNA'sında bulunan bazı genleri konak DNA'sına ekleyerek onun genetik yapısını değiştirdiği için mutasyon olarak kabul edilir. Transpozonlar ise genom içinde bir genden diğerine hareket ederler ve kromozom kopması gibi genetiksel hasarlara nedenler olurlar (Erkan 1992, Yüksel 2005, Yapıcı 2013).

Kimyasal Mutajenler:

Endüstri, kozmetik, gıda, sağlık ve çevre gibi yaşamın her alanının da kullanılan çok farklı yapılardaki kimyasal bileşikler günümüzdeki genetik hasarın artmasında en etkili faktörlerdir. Bunlar içinde genotoksik etkisi saptanmış gruplar olan baz analogları, alkilleyici ajanlar ve diğer bazı kimyasallar bulunur (Tüylü *et al.* 2009).

Kimyasal mutajenler de etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenebilirler. Bunlar;

a) *Baz Analogları*: Nükleik asit biyosentezi sırasında, pirimidin ve pürinlerin yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir ve bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır. (Öner 2003). Baz analogları bakteri kültürüne ilave edildiğinde sentezlenen DNA'nın yapısına girerler ve ilk replikasyonda çift yönlü transisyona sebep olurlar. Baz analoglarının kullanılmasıyla geri mutasyon meydana getirilebilir (Erkan 1992, Yapıcı 2013).

a) *Akridin ajanlar:* Alkilleyici ajanlar nükleotidlerin keto veya amino gruplarına $-CH_3$ veya CH_3-CH_2 gibi bir alkil grubu eklerler. “Akridin boyaları” adını alan kimyasal mutajenler çerçeve kayması mutasyonlarına sebep olur (Öner 2003). Akridin mutasyonları diğer transversiyon mutasyonlarından farklı olarak daima gen fonksiyonlarının tümüyle kaybolmasına yol açar. Birden fazla baz çifti içeren DNA segmenti gen yapısından çıkar (delesyon) ya da uzun DNA segmentleri gen yapısına girer (insersiyon). Akridin boyalarının mutasyona yol açtıkları noktalar DNA üzerinde gelişigüzel dağıtılmıştır ve bu noktalara “hot spot” (sıcak noktalar) denir (Erkan 1992). Akridin boyaları lokal antiseptik olarak, histolojide nükleik asitlerin boyanmasında, veteriner hekimlikte akut mastitis ve septisemide intravenöz enjeksiyon yolu ile kullanılır (Vural 1984).

c) *Apürinik bölgeler ve diğer lezyonlar:* Diğer mutasyon tipi de, sağlıklı bir çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin, genellikle adenin ya da guaninin, spontan olarak kaybedilmesiyle ilgilidir. Pürin halkasının 9 nolu azotu ile deoksiribozun 1 nolu karbonu arasındaki glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere “Apürinik bölgeler” (AP bölgeler) denir. Bir AP bölgedeki bir bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa genetik kodu değiştirecektir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olabilecektir. Eğer yapıya bir nükleotid girmişse, bu nükleotid genellikle yanlışır ve diğer bir mutasyonun oluşmasına neden olur (Öner 2003).

d) *Tautomerik değişimler:* Watson ve Crik DNA’ daki pirimidin ve pürinlerin tautomerik formlarda yani azotlu bir bazın her birinin, molekülde sadece tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabileceğini ileri sürmüşlerdir. Biyolojik bir öneme sahip olan tautomerler, adenin ve sitozin amino-imino formları ile guanin ve timinin keto-enol formlarını içerir. Bu tür bir kayma molekülün bağ özelliğini değiştireceğinden, tautomerik kaymaların baz çifti değişmelerine veya mutasyonlara yol açacağı ileri sürülmüştür (Öner 2003).

e) *Ultraviyole radyasyonu ve timin dimerleri*: Pirimidin ve pürinlerin UV radyasyonunu yaklaşık 260 nm dalga boyunda yoğun olarak absorbe etmeleri, nükleik asitlerin analiz ve tanısında yararlanılan bir özelliktir. UV radyasyonun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu primidinler üzerindedir. Timin-sitozin ve sitozin-sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Dimerle rDNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisinin sorumlusu olarak görülmektedir (Öner 2003).

2.3 Biyotransformasyon

Vücudumuza giren yabancı kimyasallara ksenobiyotik denir ve ksenobiyotiklerin enzim aktivitesiyle kimyasal değişikliğe uğrayarak yıkım ürününe (metabolit) dönüşmesine “biyotransformasyon” adı verilir. Biyotransformasyonla toksik etkili maddelerin daha az etkili ya da etkisiz bileşiklere dönüşmesine “detoksifikasyon” denir. Bazen biyotransformasyon sonucu daha aktif ya da toksik bileşikler oluşabilir. Bu durumda toksifikasyon (biyoaktivasyon) söz konusudur. Biyotransformasyon kapasitesi tür, cins, nesiller arası farklılık göstermektedir. Bunun yanında cinsiyet, yaş, beslenme ve maruz kalınan diğer kimyasal maddeler de biyotransformasyonu etkileyebilir (Zemheri 2011).

Biyotransformasyon özellikle, karaciğerdeki enzimler tarafından gerçekleştirilen yükseltgenme, indirgenme, dekarboksilasyon ve hidroliz tepkimelerini kapsamaktadır. Biyotransformasyon reaksiyonları sonucunda çoğu zaman polaritesi yüksek, vücuttan atılımı kolay, inaktif moleküller oluşur. Bu moleküller, ikinci bir sistemle vücuttan atılır. Bu tür reaksiyonların mikroorganizmalar aracılığı ile bilinen substratlardan yola çıkarak, laboratuvar şartlarında yeni metabolitlerin sentezlenmesine mikrobiyal biyotransformasyon denir (İşcan 2009).

Mikrozomal Enzimler

Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar. Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar (Vural 1996, Dökmeci 1994, Yapıcı 2013).

Oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzim sistemi, hücrenin endoplazmik retikulumundan elde edilen mikrozomlarda yerleşmiştir. Bu enzimler başlıca karaciğer mikrozomlarında olduğu gibi, başka dokulara ait hücrelerde de bulunmaktadır (Vural 1984). Mikrozomal enzimler, o organı oluşturan hücrelerdeki düz endoplazmik retikuluma yerleşmişlerdir. Vücuttaki diğer enzimlerden farklı olarak mikrozomal enzimler daha önce hiç karşılaşılmamış olan bir maddeyi tanıyıp onu etkisizleştirmek için molekülü parçalamak veya başka bir moleküle eklemek suretiyle başka maddelere dönüştürürler (İnt.Kyn.4)

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda iki enzim grubu yer almaktadır. Faz I reaksiyonlarında yer alan enzimler özellikle endoplazmik retikulumda bulunurken, Faz II konjugasyon enzim sistemleri ise çoğunlukla sitozoliktir. Endoplazmik retikulumda Faz I reaksiyonu ile biyotransformasyona uğrayan bir ilaç aynı hücrenin sitozolik fraksiyonunda konjuge olur (Zemheri 2011).

1- Faz I reaksiyonları: Faz I reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve hidroliz olaylarını içerir. Faz I'de lipidde çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler. Faz I boyunca hidroksil gibi bir veya daha fazla polar grup, hidrofilik moleküller ortaya çıkar. Faz I reaksiyonları ile bileşikler, faz II için uygun hale gelir ve yeterli derecede polar olan ürünler kolayca hücre ve vücuttan çıkarılır (Vural 1984, Singer *et al.* 1994).

2- Faz II reaksiyonları: Konjugasyon reaksiyonları olarak da bilinen Faz II reaksiyonları, polar bir grubun yabancı moleküllere eklenmesiyle meydana gelmektedir. Bu polar grup ya bileşik üzerinde hazır bulunan bir grup ya da Faz I reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil gibi gruplara konjuge olabilir. Polar gruplar, yabancı molekülleri suda daha çözücü yapar ve böylece vücuttan uzaklaştırmayı kolaylaştırarak toksik etkide de bir azalmaya sebep olabilir (Korkmaz 2005, Zemheri 2011).

2.4 Mutajenlerin Saptanması İçin Geliştirilmiş Kısa Zamanlı Test sistemleri ve Ames Testi

Genotoksisite testleri, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitesinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilebilmesi için kullanılmaktadır. Bu testler; fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasını, kanser riskinin tahmin edilmesini ve kanserin izlenmesini sağlayan biyoizlem testleridir (Konuk *et al.* 2008, Liman 2010, Şekeroğlu 2011).

Günlük hayatta çokça karşılaşılan doğal ya da sentetik kimyasalların büyük çoğunluğu canlıların kalıtsal materyalinde istenmeyen değişikliklere neden olacak genotoksik ve karsinojenik etkilere sahiptir. Bu kimyasalların olumsuz etkilerinden korunmak; onların tespiti, tanımlanması ve etkilerinin araştırılması ilkelerine dayanmaktadır. Bu sebeple birçok maddenin karsinojenik ve mutajenik etkilerini ortaya çıkarmak için uygulanabilecek en akıllıca yaklaşım, deney hayvanları ile yapılan *in vivo* araştırmalardır. Bu testler, kimyasal maddelerin uygulanmasıyla deney sonuçlarının alınması arasındaki sürenin fazla olmasından dolayı uzun süreli testler olarak da adlandırılmaktadır (Petek 1999, Özbek 2006, Karadayı 2010).

Uzun zamanlı test sistemleri, karsinojenite ve mutajenite araştırmalarında bilinen en hassas ve en güvenilir test sistemleri olmalarına karşın; yüksek maliyet ve zaman

gerekliliğinden dolayı yüzlerce kimyasalın karsinojenik ve mutajenik etkinliklerinin araştırıldığı öncü testlerde kullanışlı değildir (Özbek 2006).

Hassas ve güvenilir testlerin yüksek maliyetli ve uzun zaman almasından dolayı araştırıcılar, mutajen ve karsinojen özellikteki kimyasalların etkilerinin araştırılmasında esas teşkil edebilecek birçok *in vitro* kısa zamanlı test sistemi geliştirilmiştir. Uzun zamanlı test sistemlerinin aksine daha kısa sürede sonuç veren ve daha ekonomik olan bu testler; çok sayıdaki kimyasal madde ile yapılacak olan öncü testler için oldukça uygundur. Bu testlerin uygulanma esası; test edilen kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklere sahip sistemlerde belirli sonuçlar vermesi ve elde edilen bu sonuçlarla test materyalinin mutajenik ya da karsinojenik potansiyeli arasındaki ilişkinin kurulmasına dayanır. Ayrıca bu sonuçların insan da dahil bir çok canlıya uygulanabilir olması genetik kodun evrenselliği ve mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşuna bağlanmaktadır (Mortelman and Zeiger 2000, Özbek 2006, Karadayı 2010).

Kısa zamanlı testlerden alınan sonuçlar neticesinde genellikle bu testlerden sonra uzun zamanlı test sistemleri ile etkinliği teyit edilmektedir. Kısa zamanlı testlerden bazıları Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kimyasal mutajen/ kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları (Bağcı 1985).

| Test | İzelenen Genetiksel Biyokimyasal Yol | Metabolik Aktivasyon | Literatür |
|---|--|--|-------------------------------------|
| <i>Salmonella typhimurium</i> | Histidin oksotrofları | Post- mitokondriyal karaciğer fonksiyonları (S9, mikrozoimler) | Ames vd. 1973a, Maron ve Ames 1983. |
| <i>Escherihia coli</i> | Arginin-triptofan oksotrofları | Sıçan karaciğer hücreleri | Green ve Murial 1976 |
| | Profaj indüksiyonu | | Elesperu ve Yarmolinsky 1979 |
| | Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu | Slater vd. 1971 | |
| | SOS cevabı | Quillardet ve Hofnung 1985 Quillardet vd. 1985 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | DNA onarımı hatalı suşlar | - | Kada ve Hirano 1980 |
| <i>Neurospora crassa</i> | Adenin oksotrofları | - | Brokman 1984 |
| Çin hamsteri ovaryum ve akciğer hücreleri | 8-Azaguanine dirençlilik | - | Vogel ve Sobels 1976 |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Kromozal hatalar | - | Vogel ve Sobels 1976 |
| Suriye hamsteri embriyo hücreleri | Morfolojik transformasyonlar | - | Pienta vd. 1977 |
| Çin hamster hücreleri | Kardeş kromatit değişimi | - | Perry ve Evans 1975 |
| İnsan periferel kan lenfositleri testi | Kromozomal hatalar | - | Preston vd. 1981 |

Kısa zamanlı *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin mutajenik etkisinin organizmada değişmeye neden olup olmadığı, DNA tamiri ve değişimi üzerindeki etkisi ve memelilerde mutajenik etkisinin araştırılmasını içerir (Vural 1984).

Kısa zamanlı mutajenite test sistemleri ile bir kimyasalın mutajenik potansiyelinin belirlenebileceği gibi, antimutajenik etkisi de belirlenebilmektedir (Gomes-Carneiro *et al.* 2006, Bulmer *et al.* 2007). Ayrıca metabolizma sonucunda oluşabilecek ara ürünlerin mutajenik potansiyellerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Bu nedenle kısa zamanlı mutajenite test sistemleri, birçok alanda oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Soysal 2009).

Genellikle bakterilerin kullanıldığı mikrobiyal yöntemler, kısa zamanlı test sistemleri içerisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler içinde yer almaktadır. Mikroorganizmaların basit besiyerlerinde kolayca üremesi, kısa hayat döngüsüne sahip olmaları ve buna bağlı olarak yapılan uygulamaların hızlı, pratik ve düşük maliyetli olması gibi özellikler bu test sistemlerinin genel avantajlarıdır (Mortelmans and Zieger 2000).

Memeli hücrelerinde, böceklerde ve bakterilerde mutajeniteyi tanımlayabilmek amacıyla geliştirilmiş 200 den fazla kısa zamanlı test sistemi bulunmaktadır. Bu test sistemleri *in vivo* veya *in vitro* ortamlarda, DNA'da, mutasyonları indükleyerek karsinojenik ajanların taranmasını amaçlamaktadır. Yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı test sistemleri arasında *Salmonella typhimurium* kullanılarak gerçekleştirilen ve bir revers mutasyon testi olan Ames testi ayrıca lenfoma hücreleri, memeli hücreleri ve Çin hamster yumurtalık hücreleri (CHO= Chinese Hamster Ovary Cells) veya fibroblast hücreleri (V79) kullanılarak gerçekleştirilen ileri mutasyon testi, *in vitro* sitogenetik değerlendirme testleri (kromozomal hata testleri, mikronukleus testi) ve knockout transgenik fare modelleri bulunur (Bajpayee *et al.* 2005).

2.5 Ames/Salmonella/Mikrozom Test Sistemi

Tez kapsamında kullanılan test sistemi, gen düzeyinde meydana gelen mutasyonların tespitinde kullanılan, oldukça hassas bir test olan Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemidir. Kısaca Ames testi olarak da adlandırılan Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemi, 1970'li yılların başında Dr. Bruce Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilmiştir (Maron and Ames 1983). Bilim dünyasına sunulmasının ardından bu test; uygulamalarının hızı, kolaylığı ve güvenilir sonuçlar verme gibi özelliklerinden dolayı kısa zamanda dünya çapındaki araştırma laboratuvarlarında mutajenite araştırmaları için yaygın olarak kullanılan temel testler arasında yer almıştır (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu testin çok tercih edilmesinin sebebi DNA'ya zarar veren genotoksik ajanların tespit edilmesi ve yüksek hassasiyetteki mutajenik biyokimyasal mekanizmaların açıklanabilmesidir.

Test organizmaları yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş his⁻ (histidin sentezleyemeyen) oksotrofik olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ (yabanıl tip, histidin sentezleyebilen, prototrof) hale dönüşmesi temeline dayanır. Geriye dönüş yapan bakterilerin kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajeniteye maruz kalmayan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan olarak geri dönüşen kolonilerinde sayılması gerekir (Maron and Ames 1983, Almaca 1991, Mortelmans and Zeiger 2000).

Kısaca deneyin amacı; daha önceden büyümek için histidin aminoasitine ihtiyaç duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır (Maron and Ames 1983, Synder and Champness 2007).

Genel mutajenite testleri için en çok kullanılan test suşları TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 ve TA 1538'dir. Her bir test suşu histidin operonunda değişik tipte mutasyonlar içermektedir (Maron and Ames 1983).

Pek çok kimyasal madde mutajenik olmayabilir ve sonradan metabolik aktivasyon sonucu mutajenik ara ürünlere dönüşebilir. *In vivo* etkileşimi kopya edilmek amacıyla, deney sistemine çoğunlukla memeli karaciğerlerinden elde edilen metabolik aktivasyon sistemi eklenir. Sonuçta metabolitlerin mutajenik potansiyeli hakkında da sonuçlar elde edilebilir (Maron and Ames 1973, Mortelmans and Zeiger 2000, Kho *et al.* 2005, Soysal 2009).

Ames tekniğinde pozitif sonuç gösteren bir madde, insan ya da diğer memeliler de kesinlikle kanserojenik veya mutajenik olduğu anlamına gelmez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, maddenin potansiyel zararı konusunda bir ön yargı anlamı taşır. Ayrıca bu test sistemi, yüksek organizmalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir göstergedir (Eren 2011, Akyıl 2012).

Yaygın olarak kullanılan *Salmonella* test suşlarının özellikleri Çizelge 2.2’de, bazı mutant suşların DNA dizi özgüllükleri ise Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Yaygın olarak kullanılan *Salmonella* test suşlarının genotipik özellikleri (Mortelmans and Zieger 2000).

| Mutasyon | Suş | Bio chID uvrB gal | LPS hasarı | Plasmid |
|------------------------------------|------------|--------------------------|-------------------|----------------|
| HisG46 | TA 1535 | Delesyon mutasyonu | Rfa | Plazmid yok |
| | TA 100 | Delesyon mutasyonu | Rfa | pKM 101 |
| HisD3052 | TA 1538 | Delesyon mutasyonu | Rfa | Plazmid yok |
| | TA 98 | Delesyon mutasyonu | Rfa | pKM101 |
| HisC3076 | TA 1537 | Delesyon mutasyonu | Rfa | Plazmid yok |
| HisD6610 HisO1242 | TA 97 | Delesyon mutasyonu | Rfa | pKM101 |
| HisG428 | TA 104 | Delesyon mutasyonu | Rfa | Plazmid yok |
| | TA 102 | Atasal suş | Rfa | pKM101, PAQ1 |

Çizelge 2.3. Bazı *Salmonella* test suşlarının DNA dizi özgülükleri (Mortelmans and Zeiger 2000).

| Mutasyon | Suş | DNA' daki hedef bölge | Geri dönüşüm mekanizması |
|-----------------|---------|---|--------------------------|
| HisG46 | TA 1535 | -G-G-G- | Baz çifti değişimi |
| | TA100 | | |
| HisD3052 | TA 1538 | C-G-C-G-C-G-C-G- | Çerçeve kayması |
| | TA 98 | | |
| HisC3076 | TA 1537 | +1 çerçeve kayması (C-C-C- dizisinin yakınına) | Çerçeve kayması |
| | | -C-C-C-C-C- | |
| HisD6610 | TA 87 | (C dizisinin sonuna +1 sitozin) | Çerçeve kayması |
| | | | |
| HisG428 | TA 102 | TAA (ochre) | Transisyon/Transversiyon |
| | TA 104 | | |

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

Histidin Mutasyonu

Her test suşu histidin operonunun değişik bölgeleri ya da çerçeve kaymasına yol açan addisyon- delesyon mutasyonları ile mutant hale getirilmiştir (Korkmaz 2005).

His G 46 mutasyonu; His G geni bakteriler tarafından histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlayan gendir. Bu mutasyon TA 1535 ve TA 100 mutantlarında vardır. His G geninde lösin aminoasidinin kodonu –GAG- baz çifti değişimi sonucu prolin aminoasidi kodonu olan –GGG- dönüşmüştür. Bu mutasyon her iki mutantta da baz çifti

değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülür (Korkmaz 2005).

His D 3052 mutasyonu; his D geni de histidin sentezinde kullanılan histidinol dehidrogenaz enzimi kodlamaktadır. Bu mutasyon gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. TA 98 ve TA 1538 mutantlarında vardır (Korkmaz 2005).

His D 6610 mutasyonu; bu mutasyon gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır (Korkmaz 2005). Çerçeve kaymasına neden olan mutajenler DNA'nın tekrarlanan diziler ya da sıcak noktalar denilen bölgelerinde görülen kodon kaymalarını geri dönüştürerek bu kodonların yeniden doğru okunmalarını sağlarlar (Ames *et al.* 1972). TA 1538 ve TA 98 suşları, çerçeve kayması mutasyonlarına neden olan mutajen maddeler ile tekrar his⁺ hale geri dönüştürülmektedir (Maron and Ames 1983).

His G 428 mutasyonu; "ochre" stop kodonu varlığından dolayı his G geni inaktif durumdadır (Korkmaz 2005). Başlangıçta geliştirilen his⁻ mutantlarının kimyasal maddelere duyarlılığı arttırmak amacıyla çeşitli mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa Mutasyonu

Salmonella typhimurium, gram negatif bir bakteridir. Gram negatif bakterilerin peptidoglikan yapılı hücre duvarlarının dış kısmında lipopolisakkarit (LPS) bir tabaka bulunur. Bu tabakanın fonksiyonlarından biri de bakteri hücrelerinin içine kimyasal madde geçişlerini engelleyerek, bakteriyi korumaktadır.

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının LPS tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. LPS tabakasının kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir (Mumcu 2005). Bu mutasyon sayesinde, bakteri

hücre içine madde girişi kolaylaştığından, bakterinin mutajenlere karşı duyarlılığı artırılmıştır.

uvrB Mutasyonu

uvrB geni, nükleotit kesip çıkarma onarım sisteminde görevli uvrB proteinini kodlayan gen bölgesidir. uvrB mutasyonu bir kimyasala karşı, suşun hassasiyetini artırmaktadır. uvrB geninde mutasyon meydana getirirken biyotin geninde de bir delesyon olmuştur. Dolayısıyla suşlar H vitamini de denilen, biyotin geninde de hasar taşımaktadırlar. uvrB gen bölgesinde bu hasar, nükleotid kesip çıkarma onarım sisteminin doğruluğunu ortadan kaldırmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000).

R-faktörü

Ampisilin dirençlilik genidir. Bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan DNA onarımının aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçlarının artmasına, gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuç gösterirken R faktör genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir (Nakamura *et al.* 1992, Cerna *et al.* 1998, Durusoy and Kambur 2003).

TA 1538 suşuna bu plazmidin eklenmesi sonucu TA 98; TA 1535 suşunun eklenmesi sonucu ise TA 100 suşu da elde edilmiştir. Mutajenik olduğu belirlenen ajanlara karşı plazmidi taşıyan suşların hassasiyetinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çünkü bu plazmid üzerinde, hayata meyilli onarım sistemi olan SOS onarımı rekombinasyonel onarım daha fazla devreye gireceğinden kimyasal ve fiziksel mutajenlerle indüklenen mutajenite de artmış olacaktır (Mortelmans and Zeigner 2000).

2.6 Pestisitlerin Tanımı ve Tarihçesi

Pestisitler, hayvan ve insan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, tüketim, depolama ve taşıma sırasında besin değerini düşüren ya da zarara uğratan böcek, yabancı ot, kemirici, mantar gibi canlı formların yıkıcı etkisini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir (Görmez 2012).

Pestisitler ya da tarım ilaçları hastalık ve zararlılardan ürünleri korumak için kullanılan toksik kimyasal maddelerdir. Pestisitlerin kullanımı Roma ve eski Yunan'dan beri süregelen bir uygulamadır. Fakat 19. yüzyılın son dönemlerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı sonrasında zararlı, hastalık yapıcı ve yabancı otların kimyasal savaşımı konusunda önemli ilerlemeler olmuştur (Çağlarırnak 2007).

İlk pestisitler fungusit olarak kullanılan kükürt ve yine fungusit ve insektisit olarak kullanılan bakır, arsenik ve demirin basit tuzları gibi inorganik maddelerdir. Organik bileşikler olarak ilk bitki ekstratları olan nikotin, derris ve pyrethrum kullanılmıştır. Bu pestisitlerin birçoğu yüksek düzeyde toksiktir ve kullanılmaları çok tehlikelidir (WHO 2004, Çağlarırnak 2007).

Mevcut tarım alanlarından daha yüksek verim sağlamak amacıyla kullanılan pestisitlerin bilinçsizce ve denetimsiz şekilde kullanımı insan sağlığına ve en çok da çevreye olan olumsuz etkileri göz ardı edilmemelidir (Çağlarırnak 2007, Sataloğlu 2007). Pestisitlerin çevre üzerindeki etkileri; kimyasal özellikleri, uygulanma şekilleri ve uygulanma zamanlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

2.7 Türkiyede Pestisit Kullanımı

Pestisitler Türkiye'de 1965 yılından sonra teknik madde ve formülasyon olarak üretilmeye başlanmıştır. Ülkemizde imal ve ithal edilen ve piyasaya sunulan tüm pestisitler, 6968 sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu ve ilgili mevzuatlar

gereği, Tarım ve Köyşleri Bakanlığının (TKB) ruhsat ve kontrolüne tabidir. Halk sağlığı alanında kullanılanlar ise Sağlık Bakanlığı tarafından yapılmaktadır (Çolak 2009).

Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, %95'in üzerinde bir piyasaya sahip olan kimyasal mücadele bu günde geçerliliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde %60'lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır (Tiryaki *et al.*2010).

Dünyadaki toplam pestisit tüketimi yıllık 3 milyon ton civarındadır. Türkiye'de birim alana kullanılan ilaç miktarı gelişmiş ülkelere göre çok düşük düzeyde kalmaktadır. Türkiye'de ilaç kullanımı daha çok poli kültür tarımın yapıldığı Akdeniz ve Ege bölgelerinde yoğunlaşmaktadır. Entansif tarım yapılan bu bölgelerde pestisit kullanımının ülke ortalamasının çok üzerinde olduğu ve bu bölgelerde tüketimin gelişmiş ülkeler düzeyine ulaştığı söylenebilir. Yoğun pestisit tüketilen Ege ve Akdeniz bölgeleri beslenmede büyük yeri olan sebze ve meyvelerin entansif biçimde yetiştirildiği alanlar olmasının yanı sıra, ihracata yönelik gıda endüstrisinin hammaddeleri de büyük ölçüde bu bölgelerimizden sağlanmaktadır (Tebge 2012).

Türkiye'de yıllar itibariyle pestisit tüketimleri çizelge 2.4'te görölmektedir. Türkiye'de pestisit tüketiminde sırasıyla en fazla fungusit (%45), herbisit (%18) ve insektisit (%15)'ler yer almaktadır.

Çizelge 2.4. Türkiye’de Pestisit Tüketim Miktarı (kg/lt) (Tebge 2012).

| Yıllar | İnsektisit | Fungusit | Herbisit | Akarisit | Rodentisit | Diğer | Toplam |
|--------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| 2004 | - | - | - | - | - | - | 41.223.053 |
| 2005 | - | - | - | - | - | - | 43.362.627 |
| 2006 | 7.628.215 | 19.899.724 | 6.955.585 | 901.999 | 2.877 | 9.987.399 | 45.375.799 |
| 2007 | 21.045.632 | 16.706.631 | 6.668.653 | 966.488 | 50.925 | 3.277.315 | 48.715.644 |
| 2008 | 9.250.719 | 17.862.861 | 6.176.508 | 737.123 | 351.095 | 5.613.346 | 39.991.651 |
| 2009 | 9.913.897 | 17.395.950 | 5.960.852 | 1.532.728 | 77.610 | 2.302.300 | 37.183.337 |
| 2010 | 7.175.831 | 17.545.584 | 7.451.591 | 1.039.739 | 147.404 | 5.343.714 | 38.703.862 |
| 2011 | 6.119.933 | 18.123.614 | 7.406.602 | 1.061.609 | 421.426 | 6.977.775 | 40.110.958 |

Gelişmiş ülkeler pestisitlerin çevre ve sağlık açısından risklerini artık ciddi biçimde değerlendirmektedir. Bu nedenle, bir yandan pestisitleri çok bilinçli ve kontrollü kullanırken, diğer yandan da riskli pestisitlerin kullanımlarını sınırlamak ya da tamamen durdurmak yönüne gitmektedirler. Bir ülkede tüketilen pestisitlerin sağlık ve çevre kriterleri açısından nitelikleri, toplam pestisit tüketimine oranla da ciddi bir konudur. Modern dünyada insan sağlığı ve çevre büyük önem kazanmıştır. Türkiye’nin AB’ye girme girişimlerinin yoğunluk kazandığı ve birçok gelişmiş ülkeye ciddi ölçülerde tarım ürünü dış satışının sürdüğü günümüzde, sağlığı, çevreyi ve dış ticareti koruyabilmek amacıyla, tarım ilacı kullanımı gelişmiş ülkeler standartlarında, çok bilinçli ve kontrollü yapılmalıdır. Diğer taraftan AB uyum çalışmaları çerçevesinde izleme programlarının oluşturulması ve kalıntı analizlerinin rutin olarak yapılması gerekmektedir. Gıdalardaki pestisit kalıntılarını saptamaya yönelik piyasa kontrol niteliğindeki çalışmalarında önemi büyüktür (Delen *et al.* 2005).

Pestisitlerin piyasa ömrünü, çevreye olan etkisini ve insan sağlığına olan etkisini en fazla etkileyen olayların başında organizmaların pestisitlere olan duyarlılığının azalması

gelir. Bir pestisite hedef organizmanın duyarlılığı azaldıkça, o pestisitinin etkinliği de dűşmektedir. Uygulamalar da etkinliğini artırmak için devamlı olarak doz artışına gidilmektedir. Böylece doz artışına paralel olarak çevrede pestisit kalıntıları daha da fazla yoğunlaşmaktadır.

2.8 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitlerin hedef organizmalar üzerinde spesifik toksisite göstermeleri istenirken aynı zamanda hedef olmayan, zararsız organizmalar üzerinde de toksisitelerinin minimum olması istenmektedir. Bu amaçla ilk sentez edilen maddelerin ikinci ve üçüncü jenerasyonları olarak isimlendirilen daha güvenilir maddelerin sentezi yapılmıştır. Ancak, her pestisitinin belli bir toksisitesi vardır ve sağlık açısından tam güvenceli bir pestisit yoktur (Vural 2005). Pestisitler, kullanım amaçlarına, kimyasal yapılarına, toksisite derecelerine ve kalıcılıklarına göre sınıflandırılmaktadırlar (WHO 2005, Vural 2005).

a) Kullanım amaçlarına Göre;

1. İnsektisitler (böceklere karşı),
2. Fungusitler (mantar ve küflere karşı),
3. Herbisitler (istenmeyen bitki ve yabancı otlara karşı),
4. Rodentisitler (sıçan, fare ve diğer kemirgenlere karşı),
5. Akarisitler (uyuz böceklerine ve parazitlere karşı),
6. Mollusitler (yumuşakçalara karşı),
7. Larvasitler (lavralara karşı),
8. Nematositler (kurtlara karşı),
9. Bakterisitler (bakterilere karşı),
10. Avensit (kuşlara karşı),
11. Algisit (algilere karşı).

b) Kimyasal yapılarına göre;

1. Organofosforlu pestisitler: Chlorpyriphos methyl, azinphos ethyl vb.
2. Organoklorlu pestisitler: DDT, aldirin, dieldrin, endosulfan vb.
3. Karbamat grubu pestisitler: Aldicarp, ethiofencarb, carbaryl vb.
4. Piretroid pestisitler: Deltamethrin, Cypermethrin, permethrin vb

c) Toksikite derecelerine göre;

Çizelge 2.5. Pestisitlerin toksisite derecelerine göre sınıflandırılması

| Sınıf | | Sıçanlar İçin LD ₅₀ Değerleri | | | |
|------------|-------------------------|--|----------|-----------|-----------|
| | | Oral | | Dermal | |
| | | kati | sıvı | kati | Sıvı |
| Ia | Aşırı derecede zararlı | <5 | <20 | <10 | <40 |
| Ib | Yüksek derecede zararlı | 5-50 | 20-200 | 10-100 | 40-400 |
| II | Orta derecede zararlı | 50-500 | 200-2000 | 100-10000 | 400-40000 |
| III | Az derecede zararlı | >500 | >2000 | >1000 | >4000 |

d) Kalıcılıklarına göre

1. Kalıcı olmayanlar: birkaç günden 12 haftaya kadar etkisini sürdürenler
2. Orta derecede kalıcı olanlar: 1- 18 ay arasında dayanabilenler
3. Kalıcı olanlar (persistent): birçok hidrokarbon bu gruba girmektedir. DDT, aldrin, dieldrin gibi maddeler 20 yıl kadar dayanabilmektedir.
4. Sürekli kalıcılar (permanent): Civa, kurşun, arsenik (Güler ve Çobanoğlu 1997).

2.8.1 Organofosforlu Pestisitler

Günümüzde en çok kullanılan pestisit grubu organofosforlu pestisitlerdir. Günümüzde 200'den fazla farklı organofosforlu insektisit etkili aktif madde bulunmaktadır (Vural 2005). Çoğunlukla insektisit olarak kullanılmalarına rağmen herbisit ve diğer etkileri içinde kullanılmaktadırlar (Berlie 2004).

Organofosforlu pestisitler, 1973 yılında Almanya'da Schrader önderliğinde bir grup kimyager tarafından sentezlenmiştir. Sentezlenen ürünlerin son derece toksik olduğu gösterilmiştir ve İkinci Dünya Savaşında Nazilerin kontrolünde tutulmuştur. Kimyasal savaş ajanı olarak geliştirilen sarin, soman ve tabun çok toksik olup "sinir gazı" olarak adlandırılır. Daha sonra memeliler için oldukça toksik olan ve insektisit özelliği bulunan bileşiklerden bu amaçla ilk önce TEPP (tetraetil pirofosfat) sentezlenmiştir (Berlie 2004, Elersek and Filipic 2011).

Organofosforlu pestisitler biyolojik etkilerini, enzim inhibitörü olarak gösterirler. Esterazlar böcek ve memeli türlerindeki organik fosforlu toksisitesi için hedef enzimlerdir (Marrs 1993, Vural 1996, Klassen *et al.* 2001, Akyıl 2012)

2.8.2 Organoklorlu Pestisitler

Organoklorlu pestisitlerin kullanımı geçmiş yıllarda çok yaygınken insan sağlığına, çevreye olan zararlı etkileri ve doğadaki kalıcı etkileri kanıtlandıktan sonra kullanımı büyük ölçüde yasaklanmıştır. Bu sınıfın ilk üyesi 1874 yılında O. Zeidler tarafından sentezlenen trikloro difenol trikloroethan (DDT)'dir. Bu maddenin insektisit özelliği 1939 yılında İsviçre'li P. Mueller tarafından keşfedilmiş ve bu buluşundan dolayı 1948 yılında Nobel ödülü kazanmıştır. Daha sonraki yıllarda benzenheksaklorür, toksafen, metoksiklor, aldrin, dieldrin, lindan9 sentezlenmiş ve günümüzde Türkiye'de de organoklorlu pestisitlerin kullanımı yasaklanmıştır (Vural 2005, Costa 2007).

2.8.3 Karbamat Grubu Pestisitler

N-metil karbamatlar, tarımda ekinlerin korunması amacıyla akarisit, insektisit, nematosit ve mollusit olarak organoklorlu pestisitlerin yerine yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride ve evlerde biyosit olarak kullanılmaktadır. Karbamat grubu pestisitler, 1950'li yıllarda üretilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sentetik pestisitlerin büyük kısmını oluşturan bu bileşikler son 50 yılda oldukça geniş ölçekte geliştirilmiş, üretilmiş ve kullanılmıştır. 50'den fazla karbamat grubu insektisit bulunmaktadır (WHO 1986, İncedere 2009).

Karbamatlar yapı olarak organofosfatlara benzerler ve kolin esteraz enzimini geçici olarak inhibe ederler ve bu etkileri geri dönüşlüdür. Enzim aktivitesinin tekrar normal haline dönmesi dakikalar ve hatta saatler içerisinde olur, klinik zehirlenme belirtileri organofosfatlı insektisitlerinkine benzerdir ancak organofosfatlı insektisitlerdeki gibi yeni enzim sentezi gerekmediğinden toksik etki kısa sürelidir. Karbamatların merkezi sinir sistemi penetrasyonu daha zayıf olduğundan, toksisitesi daha nadir görülür. Çocuklarda ise merkezi sinir sistemi bulguları daha siktir ve kolinesteraz aktivitesinin seviyesi 4-8 saat içerisinde normale döner (Kahraman 2008).

2.8.4 Piretroid Grubu Pestisitler

Piretrinler krizantem çiçeğindeki krizantemik asidin ve piretrik asidin esterlerinin ekstre edilmesiyle doğal olarak elde edilirler. Piretrium çiçeklerinde bulunan piretrin I ve II ile sinerin I ve II etkin maddeleri insektisit olarak kullanılmaktadır. Piretrium ekstratı %1-2 piretrinleri içermekte olup bu tozların insektisit etkisinin tespiti 1880'li yıllara dayanır. Krizantem çiçeğinin böcek öldürücü etkisi Farmlar zamanında fark edilmiştir. Doğal piretrinlerin insektisit olarak birçok avantajı vardır. Geniş spektrumlu olmaları, memelilerde zehirliliklerinin ihmal edilebilir düzeyde olması ve doğal koşullarda kısa sürede bozulmaları en önemli avantajlarıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda güneş ışığına daha dayanıklı permetrin, cypermetrin, deltametrin gibi piretroidler

sentezlenmiştir. Piretroidler doğal olarak elde edilen piretrinlerin sentetik ester türevleridir. Piretroidler, İsektisidal özellikleri yönünden doğal piretrinlere çok benzerler. Birden fazla piretroidler kendi aralarında veya diğer bileşiklerle kombine edilerek daha çabuk ve daha güçlü öldürücü etki elde edilebilir (WHO 2005,Çolak 2009).

Piretroidler dünyada 30 yılı aşkın bir süredir tarımda, halk sağlığı için evlerde ve küçükbaş hayvanlarda ektoparazitlere karşı yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük memeli toksisiteleri nedeniyle piretroid bileşiklerin kullanımı son zamanlarda artış göstermiştir ve 1990'ların ortalarında dünya insektisit pazarının %23'ünü piretroid bileşikler oluşturmuştur. Piretroidler organofosforlu pestisitlerden sonra en yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir (Soderlund *et al.* 2002, Piner 2009).

Piretroid grubu pestisitler günümüzde en yoğun olarak kullanılan insektisit grubudur. Hedef olmayan pestisitler üzerinde daha az toksiktirler ve genelde temas yolu ile etkilerini gösterirler. İki gruba ayrılırlar (Çakır 2008):

Doğal Piretrinler

Pire otu bitkisinden elde edilir. Piretrin I-II, Cinerin I-II ve Jasmolin I-II içerirler. Işık ve hava teması ile hızlı bir şekilde parçalanırlar. Sinerjistik etkisiyle insektisit aktivitesi artırılır. Ratlarda akut oral ölümcül değeri 200-4910 mg/kg arasında olduğu bildirilmiştir (EMEA 1998, Çakır 2008).

Yapay Piretroidler

Sentetik piretroidler olarak adlandırılan bu grup, doğal piretrinlerin alkol ve asit köklerinde yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir. Doğal piretrinlere göre kalıcılıkları daha fazladır. Bu grup insektisitler, yapılarına göre öldürücü ve yere serici etkiye sahip

olabilirler. Formülasyonlarında genellikle bu iki piretroid bir arada kullanılmaktadır. Ayrıca sinerjist kullanımı da piretroidlerin etkisini arttırmaktadır. Bu grupta λ -siyhalotrin, sipermetrin, deltametrin, permetrin ve fenvalerat yaygın şekilde kullanılırlar.

Dünyada kullanılan pestisitlerin %30'unu sentetik piretroidler oluşturmaktadır ve hedef organizmaya karşı çok toksik, memeliler ve kuşlara karşı az toksik olmaları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedirler (Mazmancı *et al.* 2008).

Piretroid Grubu Pestisitlerin Etki Mekanizması ve Yapısı

Sentetik piretroidler, toksik etkilerini böceklerdeki ve memelilerdeki sodyum kanalları üzerinde göstererek, periferik ve merkezi sinir sistemlerindeki aksonları etkileyen sinir sistemi zehirleridir (WHO 1990). Böceklerde periferik ve merkezi sinir sisteminde sinir kılıflarını etkilerler (sodyum kanalları), sodyum kanallarındaki sinirsel uyarımı boşaltıp sonlandıran bir proteine bağlanırlar. Piretroidler bu proteine bağlandıklarında sinir uyarımı sonlanmaz ve sürekli uyarım gerçekleşir. Sonuçta sinir sistemi kontrol dışı kalır ve koordinasyon kaybı şekillenir (Valles and Koehler 2003). Piretroidler kolay bir şekilde metabolize edilmelerinden dolayı çoğu hayvanda oldukça kısa bir ömre sahiptir. Fakat balıklarda piretroidleri hidrolize eden enzim sistemlerinden yoksun oldukları için balıklar için daha çok toksiktirler (Haya 1989).

Piretroid insektisitler, doğal piretrinlere benzer şekilde, temas yoluyla ve mide zehiri olarak etki gösterirler. En dikkat çekici özellikleri insektisitler üzerinde hızla gelişen yere serici etkinliğe sahip olmalarıdır. Yağda çözünme özellikleri sayesinde böcek kutikulasından hızla emilerek toksik etkilerini gösterirler (Çakır 2008). Bilimsel literatür de sentetik piretroidlere ait çalışma sayısı diğer pestisit gruplarına oranla daha azdır.

Piretroidler geniş insektisidal spektruma sahiptirler. Etki alanına sivrisinek ve karasinekler, hamam böcekleri, tahtakuruları, pireler gibi zararlılar girer. Belirtilen

üstün özellikleri nedeniyle piretroidler, son yıllarda açık ve kapalı alanlarda sinek ve sivrisinek kontrolü çalışmalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Çakır 2008).

Piretroidlerin birçok alanda yaygın olarak kullanımından kaynaklanan etkilerinin yanında bu bileşikler çevredeki birikmeleri ile de zararlıdırlar (Grossman 2007).

Birçok piretroid, ester ya da eter bağı ile aromatik alkollere bağlı olan siklopropan karboksilik asid grubu taşır. Bu temel piretroid yapısındaki modifikasyon insektisit aktivitesini ve fotostabilitesini artırmak için düzenlenmiştir ve bu durum hedef olmayan türlerde piretroid aktivitesinin değişmesine neden olabilir. Diğer önemli bir modifikasyon alkol grubuna α - siyano grubunun eklenmesidir ve bu eklenme insektisit aktivitesinde kritik role sahip olduğu için sentetik piretrin analoglarının geliştirilmesinde önemlidir. Piretroidler chiral moleküllerdir ve piretroidlerin konformasyonları biyolojik aktivitenin en önemli belirleyicisidir. Chiralite diğer pestisit gruplarının da biyolojik aktivitesini etkilemektedir. Piretroidler 2 ya da 4 chiral merkeze sahiptir. Aynı bileşiğin stereoizomerleridir. Piretroidlerin α -siyano grubu taşıyanları bu grubun uzaydaki konumuna bağlı olarak farklı izomerik konfigürasyona sahip olabilir (Piner 2009).

Piretroidler sinir sisteminde voltaj bağımlı sodyum kanallarını düzenleyen proteinlere bağlanarak toksik etki gösterirler. Voltaj bağımlı sodyum kanalları aksone iyonların girişine izin veren yollardır ve eksitasyon ile sinirsel sinyal iletimini sağlar. Bu kanallar aracılığı ile sinyal iletimi gerçekleşirken kanallar açılır ve sinyalin sonlandırılması için kapanır. Herhangi bir nedenle bu kanal açık kaldığında sinir hücreleri sürekli uyarılarak sonuçta paralizi durumu ortaya çıkar. Piretroid insektisitler voltaj bağımlı sodyum kanallarına bağlanarak kapanmasını engellerler. Tip I ve Tip II piretroidlerin siyano grubu taşımalarına bağlı olarak toksik semptomları farklıdır. Piretrin gibi Tip I piretroidler merkezi sinir sisteminde bulunan sodyum kanallarını kesintiye uğratarak nörotoksisiteye neden olurlar. Lamda- Cyalothrin gibi Tip II piretroidler sinirsel işlevler için önemli olan klor ve kalsiyum kanallarını etkilerler (He *et al.* 2008).

Piretroidler lipofilik oldukları için biyolojik membranlar ve dokular tarafından kolayca alınabilirler. Piretroid etkisindeki organizmalarda titreme, hipereksitasyon, parazi, konvülsiyon ve bunları takiben ölüm meydana gelebilir. Piretroidler beyinin hippocampus bölgesinden asetilkolinesteraz (AChE) salınımını düzenlerler ve ATPaz aktivitesini inhibe ederler. Hormonal işlevleri de kesintiye uğratabilirler. Memelilerde piretroidler progesteron ve estradiol sentezini azaltabilir ve erkeklerde antiandrojenik etki, kadınlarda östrojenik etki gösterirler. Bunların dışında piretroidlerin hücre döngüsünü inhibe ederek hücre stresine neden olduğu ve immun sistemi baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli etkide solunum organlarının yüzeyinde hasara neden olurlar ve renal iyon düzenlenmesini kesintiye uğratabilirler (Oros and Werener 2005)

Piretroidler oral olarak alındığında toksik etkileri düşüktür, bulantı, kusma, baş dönmesi, karın ağrısı, bulanık görme, yorgunluk ve parestezi başlıca belirtileridir. Piretroidler yüksek dozda alındıklarında ise merkezi sinir sistemini uyarırlar ve hiperaktivasyon, hiperapne, koordinasyon bozukluğu ve konvülsiyonlara neden olur. İnsanlarda piretroidlerin teması ile yüzeyde meydana gelen belirti parestezidir. Kızarıklık, kaşıntı, burun akıntısı, gözlerde yaşarma ve deride kızarıklık başlıca belirtileridir (Costa 2007).

2.9 Pestisitlerin İnsanlar Üzerindeki Etkileri

Pestisitlere maruziyet; tarlada, bahçede, ev ortamında çeşitli amaçlarla kullanım esnasında, depolama, nakil, üretim veya atılmaları durumunda bulaşma yolu ile meydana gelebilmektedir. Pestisit kutu ve ambalajlarının uygun şekilde imha edilmeyip ev veya çalışma ortamında kalmaları, dikkatsizlik veya kaza ile yiyeceklerin ve içme sularının kontamine olması maruziyet riskini artırmaktadır. Bu maddelerin canlı organizmalara geçişi, inhalasyon, dermal, oral, gözler ve parental yollarla olmaktadır (Vural 1996, Klassen 2001, Dağlıoğlu 2004).

Pestisitler çevreye ve insanlara olan zehirliliklerine göre de sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırmada pestisitlerin akut zehirlilikleri göz önünde tutulur. Sınıflandırma Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır. Pestisitler çok zehirli, zehirli, orta dereceli zehirli ve az zehirli olarak dört sınıfa ayrılırlar (Mercan 2010).

Pestisitler hedef olmayan organizmalara çeşitli yollarla girmekte ve organizmada endokrin sistemi, sinir sistemi, bağışıklık sistemi, karaciğer, kalp, kas, boşaltım, kan ve diğer sistemleri etkileyebilmektedir. Pestisitlerin çevrede oluşturduğu kalıntılar çok yönlü karmaşık özelliktedir. Bunlar, birikme özelliğine sahiptir (Mercan 2010).

Kimyasal maddeler iki tipte zehirlilik gösterirler.

1-) Akut Zehirlilik: tek bir dozda alındığında kısa sürede ortaya çıkan ve belirtileriyle tanımlanabilen zehirliliktir.

2-) Kronik Zehirlilik: uzun süreçte, öldürücü doz altındaki tekrarlı alımlarda ortaya çıkan zehirliliktir.

Akut zehirliliğin ölçüsü LD₅₀ değeridir. LD₅₀ ağız ve deri yolu ile deneme hayvanlarına uygulandığı zaman, bunların %50'sini öldüren dozdur ve mg/kg ile ifade edilir. Düşük LD₅₀ değeri o bileşiğin zehirliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Ware 1986, Mercan 2010).

Kamal ve arkadaşları (1990) tarım alanlarında 3-15 yıl ilaçlama yapan işçiler üzerinde yaptıkları çalışmalarda serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), Laktat dehidrogenaz (LDH) ve Alkalen Fosfataz (Alp) enzimlerinin aktivitelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Tarım ilaçlarının kanda eritrosit ve lökositlere de zarar verdiği yapılan hayvan deneyleri ile belirlenmiş

2.10 Pestisitlerin Çevreye ve Ekolojiye Etkileri

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması esnasında bir kısmı buharlaşma ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer bir kısmı toprak yüzeyinde ve bitki üzerinde kalmaktadır. Havaya karışınca pestisit rüzgârla taşınabilir; sis, yağmur veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bu türler üzerinde kalıntı ve toksisiteye neden olabilir (Kiziewicz *et al.* 2002).

Pestisitler genel olarak bitki yapraklarına, toprak yüzeyine veya toprağın içine karıştırılacak şekilde uygulanır. Pestisitler kimyasal yapıları bakımından çeşitlilik göstermektedirler. Dolayısıyla da topraktaki davranışları büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir (Sağlam 2008).

Pestisitler kullanılırken doğrudan toprağa uygulansalar bile pestisit uygulanmasından sonra, topraktan ve uygulanan vejetasyondan buharlaşarak, rüzgar yoluyla atmosfere girer. Pestisit atmosfere girdiğinde, atmosferden su yüzeylerine aktarılır ve su yüzeylerinde toplanır. Ayrıca toprağa düşen pestisitler toprak yapısını ve toprakta yaşayan canlıları olumsuz etkileyebilir (Kumbur *et al.* 2005).

Pestisitlerin, çevre ve çevredeki diğer organizmalar üzerinde de olumsuz etkileri vardır. Pestisitler arılar, balıklar, kuşlar, omurgasızlar ve mikroorganizmalar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümlere neden olabilirler. Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalmasına sebep olabilirler (Yücel 2007). Yine pestisitler hedef olmayan organizmalarda dayanıklılık oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan parazit ve böceklerin kontrolden çıkmasına neden olabilirler ve ekosistemin yapısının bozulması ve türlerin sayısının değişmesi gibi uzun dönemli etkilere sebep olabilirler (Öğüt *et al.* 2008).

Ayrıca pestisitler toprağa düşen ilaçlar, sulama ve yağmur suları ile yer altı sularına, akarsu ve göllere dolayısıyla su ekosistemine karışarak burada yaşayan canlıların zehirlenmelerine ve ölümlerine neden olabilirler (Öğüt *et al.* 2008).

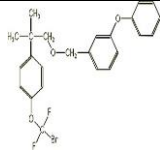
2.11 Pestisitlere Bağlı Zehirlenmeler

Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımı nedeniyle toprakta, suda ve gıda maddelerinde pestisit veya metabolitleri birikebilmektedir. Bu aşamada diğer canlılar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülebilmektedir. Bu durum ilk olarak 1984 ve 1952 yıllarında insan vücudunda organoklorlu pestisitlerin kalıntılarının saptanmasıyla fark edilmiştir (Yücel 2007).

Pestisitlere çeşitli şekillerde maruz kalma nedeniyle akut ve kronik zehirlenmeler, dolayısıyla basit etkilenmeden ölüme kadar çeşitli durumlar meydana gelebilmektedir. Pestisitlerin %75-80 gibi büyük bir bölümünün gelişmiş ülkelerde kullanılmasına karşın, zehirlenme olgularının çoğu gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarında, her yıl yaklaşık olarak 3 milyon pestisit zehirlenmesi meydana geldiği ve bu zehirlenmelerin 220.000'inin ölümlerle sonuçlandığı belirtilmektedir (Vural 1996, Malley 1997, Dağlıoğlu 2004, WHO 2007, Akçan 2008)

Bu çalışmada kullanılan Halfenprox pestisitinin dahil olduğu gruba ait zehirlenme belirtileri göz ve cilt tahrişi, anormal yüz hissi, deride karıncalanma ya da uyuşukluk, sinirlilik, ayrıca baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma, ishal, aşırı tükürük salgısı, yorgunluk gibi belirtilerdir. Ağır zehirlenme vakalarında; seğirme, akciğer ve kaslarda sıvı oluşumu gelişebilmekte, nöbetler oluşabilmektedir (İnt.Kyn.5). Halfenprox pestisitinin genel özellikleri Çizelge 2.6 da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan pestisitinin genel özellikleri

| Yaygın Adı | Kimyasal Adı | Kimyasal Yapısı | Kimyasal Formülü | Sınıfı | Kullanım Alanı | Fiziksel Durumu |
|------------|--|---|---|----------------|---------------------|-----------------|
| Halfenprox | 1 - ((2 - (4 - (bromodifluoromethoxy)fenil)-2-metilpropoksi)metil)-3-fenoksibenzen |  | C ₂₄ H ₂₃ BrF ₂ O ₃ | Pyretroid eter | İnsektisit Akarisit | Renksiz |

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerden nutrient broth no:2 Oxoid markalı olup, diğer kimyasallardan D-Biyotin, L-Histidin-HCl, ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit, kristal viyole, glukoz, agar, potasyum klorür, magnezyum klorür, sodyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, glukoz-6-fosfat, S9 fraksiyonu, 2-aminofluorene, 2-aminoanthracene ve 4-nitro-o-fenilendiamine Sigma, Sodyum azid ise Riedel'den alınmıştır. Diğer kimyasal maddeler ise Sigma Aldrich'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan Halfenprox (CAS no 111872-58-3) ise piretroid grubuna giren bir pestisit olup Fluka'dan alınmıştır.

3.1.2 *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Çalışmamızda, Maron ve Ames (1983) tarafından, *S. typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır (Maron and Ames 1983). Bu suşlar Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden olan Prof. Dr. Nuran Diril'den temin edilmiştir. TA 98 suşu kodon kayması, TA100 suşu baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların tespitinde kullanılmıştır.

Deneyler S9'lu ve S9'suz olarak iki grup halinde çalışılmıştır. Uygulanan her doz için 3 plak kullanılmış ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, negatif kontrol ve spontan kontroller de belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak TA 98 S9'lu deneylerde 200 μ g/plak 2-aminofluorene, TA 98 S9'suz deneylerde 200 μ g/plak 4-nitro-o-fenilendiamine, TA 100 S9'lu deneylerde 5 μ g/plak 2-aminoanthracene, TA 100 S9'suz deneylerde 10 μ g/plak sodyum azid kullanılmıştır.

Çalışma Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

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

| | |
|--|----------------|
| | <u>1000 ml</u> |
| Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 10 g |
| Sitrikasit monohidrat | 100 g |
| Potasyum fosfat (K_2HPO_4) | 500 g |
| Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2NH_4 PO_4 \cdot 4H_2O$) | 175 g |
| Distile su (45 °C) | 670 ml |

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

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

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

| | |
|------------------------|---------------|
| | <u>250 ml</u> |
| D-Biyotin (F.W. 247,3) | 30,9 mg |

| | |
|-----------------------------|---------|
| L-Histidin-HCl (F.W. 191,7) | 24,0 mg |
| Distile su | 250 ml |

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

(%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

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

| | |
|-------------------------|---------------|
| | <u>100 ml</u> |
| Ampisilin trihidrat | 0,8 g |
| 0,02 N Sodyum hidroksit | 100 ml |

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

(%1) Kristal Viyole Solüsyonu

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

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

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

(%0,13) Biotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

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

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

(%0,5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

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

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

(%20) Glukoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

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

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

(2 µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO)'de çözülerek kullanılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır. +4 °C'de saklanmıştır.

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

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

Kullanım: Pozitif kontrol

2 µg/plak olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu gerektirmeyen kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

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

(0,1 µg/µl) Sodyum Azid (SA)

Kullanım: Pozitif kontrol

10 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda kullanılan kimyasaldır. +4 °C'de saklanmıştır.

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

(0,05µg/µl) 2-Aminoanthracene (2AA)

Kullanım: Pozitif Kontrol

5 µg/plak başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında kullanılan kimyasaldır.

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

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

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

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

Histidin/Biyotin Plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

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

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 45 °C'ye soğutulup %20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiş, solüsyon biraz daha

soğuduktan sonra biyotin ilave edilmiş, karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtılmıştır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

| | |
|-------------------------------|----------------|
| | <u>1000 ml</u> |
| Agar | 15 g |
| Distile su | 910 ml |
| 50XVB tuzları | 20 ml |
| %20 glukoz | 50 ml |
| Histidin HCl.H ₂ O | 10 ml |
| 0,5 mM Biyotin | 6 ml |
| (%0,8/0,02 NaOH) Ampisilin | 3.15 ml |

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

Minimal Glukoz Agar Plakları

Kullanım: Mutajenite deneyi

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

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

Nutrient Agar Plakları (NA)

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

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

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

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

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

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

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

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

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

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

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

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

500 ml

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

Karışım pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

0,1 M β -NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

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

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

1 M Glukoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

| | |
|-------------------|--------------|
| | <u>10 ml</u> |
| Glukoz-6-fosfat | 2,82 g |
| Steril distile su | 10 ml |

Sterilizasyon 0,22 μm delik çaplı filtrelerle yapılmıştır.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

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

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

3.2 Metod

3.2.1 Test Maddesinin Dozları ve Hazırlanışı

Çalışmamızda piretroid eter sınıfından Halfenprox pestisitinin mutajenik etkisi Ames/*Salmonella*/Mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Uygulanacak dozları belirlemek için Halfenprox'un 6,25µg/plak, 12,5µg/plak, 25µg/plak, 50µg/plak, 100µg/plak konsantrasyonları kullanılmıştır ve denenen madde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 *Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

Bakteri kültürleri Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda iyi izole olmuş kolonilerde biri seçilip, 2 ml Nutrient Broth (NB) ortamı içerisinde süspansiyon edilerek bir gece (12–16 saat) 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra steril bir öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekimi yapılmıştır. Plaklar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 4°C'de saklanmıştır. Bu plaklar 2 ay süresince saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

3.2.3 *Salmonella* Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerin Açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmesi için stoklanması gerekir. Genetik kontrolleri yapılarak HBA'ya ekilmiş olan bakterilerden tek koloniler alınarak 2 ml NB içinde 37 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 90 µl DMSO ilave edilmiş yavaşça karıştırılmıştır. Sonrasında kapakları sıkıca kapatılarak sıvı azot içerisine daldırılıp çıkartılmış ve böylece şok donmaları sağlanmıştır. Şok dondurulan kültürler stok olarak

kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. Bu stok kültürler 1–2 yıl süre ile tazeliklerini koruyabilmektedir.

***Salmonella* Suşlarının Gecelik Kültürlerinin Hazırlanması**

TA 98 ve TA 100 suşları için, master plaklarından iyi üremiş bir koloni öze yardımı ile alınarak 20 ml NB ve 63 µl ampisilin içerisinde süspansiyon edilmiş ve 140 rpm'de 16 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze kültür hazırlamak için 16 saatin sonunda bu kültürlerden 500 µl alınıp 20 ml NB ve 63 µl ampisilin içerisinde süspansiyon edilmiş ve 110 rpm'de kullanımına kadar inkübasyonu sağlanmıştır.

3.2.3.1 Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Ames testinin güvenilirliği açısından kullanılacak olan test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekmektedir. Bu nedenle, bakterilerin genotipleri çeşitli testler ile kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin his⁻ yapısından his⁺ yapısına geçişi MGA üzerine ekilmeleri sonucu ayırt edilmiştir. Bu kontrol için, bir gece NB içerisinde büyütülen kültürlerden steril öze ile alınan his⁻ bakteriler MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 48–72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonu taşıdığı anlaşılmıştır.

UvrB mutasyonu kontrolü

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tesbit edilmiştir. Kullanılan UV ışının dozu, uvrB mutasyonunu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Bu mutasyon ile bakterilerin UV ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir. Bu test için, NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen steril bir öze yardımıyla bir öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılıp 33 cm. yüksekten 8 sn süre ile 15 watt gücündeki UV lambasına maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda plaklar kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek bakterilerin üreme durumlarına bakılmıştır. UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu durum bize kullanılacak olan bakterilerin uvrB mutasyonu taşıdığını gösterir.

Rfa mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş olup hücre duvarının geçirgenliği arttırılmıştır. Rfa mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2 ml top agara 0,1 ml. gecelik bakteri kültürü ilave edildikten sonra NA plaklarına karışımın homojen dağılması için 8 işareti yapılarak ekilmiştir. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril disk yerleştirilip diskin ortasına %0.1'lik 10 µl kristal viyole damlatılmıştır. Disk boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip bakterinin üremesini etkilediği için bakterilerin Rfa mutasyonu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R-faktör varlığı kontrolü

Test bakterilerinin içeriği, R-faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tesbit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (% 0.8 Ampisilin/ 0.02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir. Yani testte kullanılacak olan bakterilerde R-faktör plazmidini bulmaktadır.

Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ fenotipinden his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 100 için 75–200 revertant/plak; TA 98 için 20–50 revertant/plaktır. Bu test için, 37 °C'deki etüvde 110 rpm'de NB'de büyütülen bir gecelik kültürlerden 0,1 ml alınıp, 45 °C'deki su banyosunda tutulan 0.25 ml 0,5 M histidin-biyotin solüsyonu içeren 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C'deki etüvde 48–72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayısı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır.

3.2.4 Sıvı Kültürün ml'sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA plaklarından iyi üremiş kolonilerden biri öze yardımı ile alınarak 20 ml NB içerisine eklenmiştir. Daha sonra, kültür çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de 110 rpm' de 12–16 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda gecelik kültürden 100 µl alınıp 20 ml NB içerisine eklenerek taze kültürleri hazırlanarak 140 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda taze kültürün %0,9 serum fizyolojik ile 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ olacak şekilde sulandırılmaları yapılmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına

her bir konsantrasyondan 3 petri olacak şekilde 100 µl' lik miktarlarda alınarak 45 °C' deki su banyosunda tutulan 2,5 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra test tüpü çalkalanarak NA plaklarına 8 işareti yapılarak yavaşça yayılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* ile yapılan mutajenite testlerinde kullanılan bakteri kültürünün 1 ml'sinde $1-2 \times 10^9$ ml/bakteri olması öngörülmektedir.

3.2.5 Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Test bileşenlerinin sitotoksik etkilerinin saptanması Dean ve arkadaşlarına (1985) göre yapılmıştır. Buna göre, 2 ml top agara TA 100 suşunun gecelik kültüründen 100 µl ve DMSO içerisinde çözülmüş test bileşiğinin değişik konsantrasyonlarından (6,25µg/plak, 12,5µg/plak, 25µg/plak, 50µg/plak, 100µg/plak) ilave edilerek NA plaklarına ekilmiştir. Plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlenmiş ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik olan ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Her bir doz için 3 plak kullanılmıştır.

3.2.6 S9 Karışımının Hazırlanması

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

3.2.7 Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

Ames testinin amacı, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine ihtiyaç duyan mutant oksotrofik suşların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir

hale dönüştürme gücünü ölçme temeline dayanmaktadır. Ayrıca test bileşeninin etkilerinin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacı ile deneyler S9' lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde yapılmıştır. Ames testi, Maron ve Ames (1983)' e göre yapılmıştır.

3.2.7.1 S9'suz Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 0,1 ml ve 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 0,1 ml eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deneyde TA 98 ve TA 100 için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Bağımsız iki deney yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol ve pozitif kontrol kullanılmıştır.

3.2.7.2 S9'lu (+) Deney

Bu deneyde, 45 °C'lik su banyosunda tutulan ve içerisinde 0.25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2,5 ml'lik top agara test maddelerinin değişik konsantrasyonlarından 0,1ml, 5 saatlik taze bakteri kültürlerinden 0,1ml ve S9 karışımından 0,5 ml eklenmiştir. Tüpler düşük hızdaki vorteks ile yavaşça karıştırılarak daha önce 37 °C'de bekletilen MGA plaklar üzerine 8 işareti yapılarak karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. 15 dakika agarın donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 48–72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney TA 98 ve TA 100

için her bir doz 3 ayrı plağa ekilmiştir. Deneyde her suşun geri dönme özgüllüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen kullanarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. S9 karışımı, bakteri ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geridönen bakteri sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olarak uygulanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır.

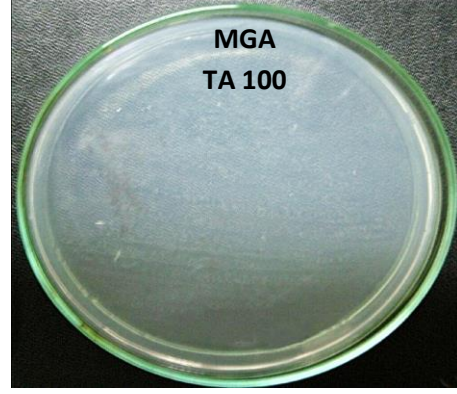
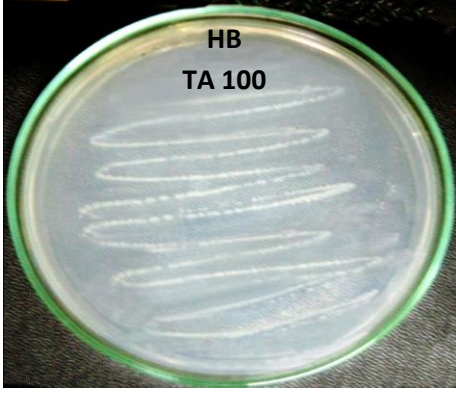
Elde edilen verilerin istatistiki analizi, SPSS programı Oneway ANOVA Dunnett-t testine göre yapılmıştır.

4. BULGULAR

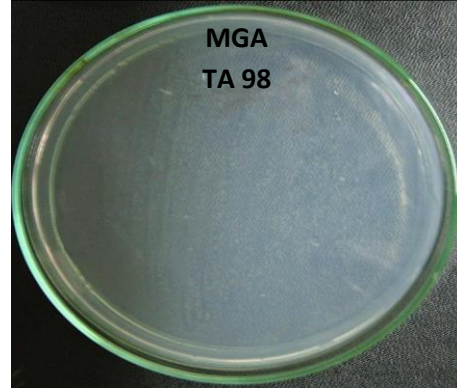
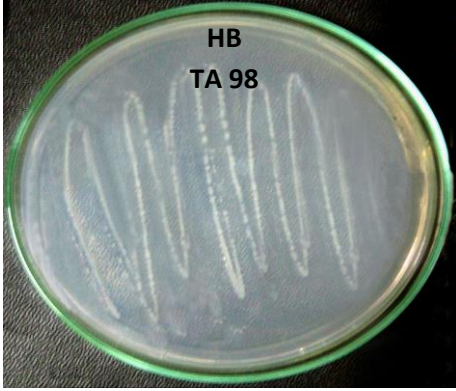
Çalışmamız zirai mücadelede sebze ve meyve mist ve diğer böcekleri kontrol etmek amacıyla sıklıkla kullanılan Halfenprox pestisitinin mutajenik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla histidin üretmeyen *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak, bu suşların histidin üretebilir hale gelip gelmediklerine bakılarak Halfenprox pestisitinin mutajenitesi belirlenmiştir. Histidin üretebilir hale gelen bakterilerin oluşturdukları koloni sayısı, negatif kontrol grubunun koloni sayısı ile karşılaştırılmıştır. Buna göre negatif kontrol sayısını iki katına çıkaran konsantrasyon değeri mutajenik konsantrasyon olarak kabul edilmektedir. Koloni sayısında doza bağlı bir artış olma durumunda ise bu maddenin, zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (Mortelman and Zeiger 2000).

Genetik İşaretlerin Kontrolü

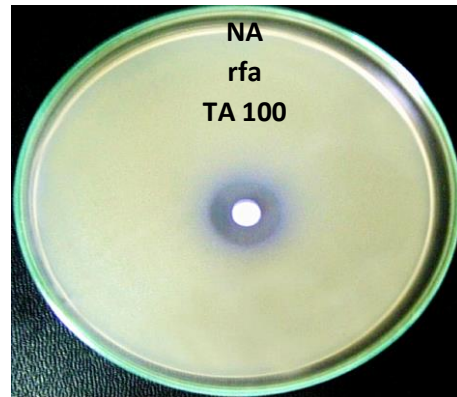
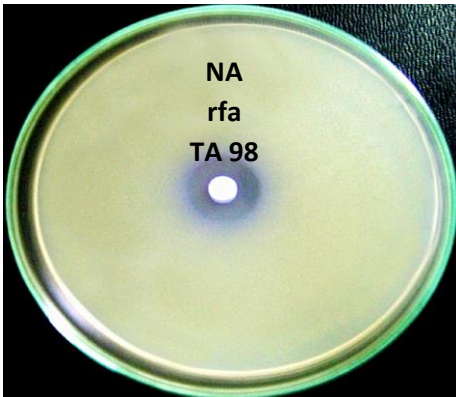
Deneyden önce kullanılacak olan TA 98 ve TA 100 suşlarının histidin gereksinimi, *uvrB* mutasyonu, *rfa* mutasyonu, R-faktör varlığı ve spontan olarak geriye dönen koloni sayısı bakımından genetik işaretlerinin kontrolü yapılarak deney için uygun özelliğe sahip olup olmadıklarının kontrolleri yapılmıştır. TA 100 suşunun histidin gereksinimi (Resim 4.1), TA 98 suşunun histidin gereksinimi (Resim 4.2), TA 100 ve TA 98 suşlarının *rfa* mutasyon kontrolü (Resim 4.3), *uvrB* mutasyonu (Resim 4.4), R-faktör varlığı (Resim 4.5), spontan olarak geriye dönen koloni sayısı (Resim 4.6)'da verilmiştir.



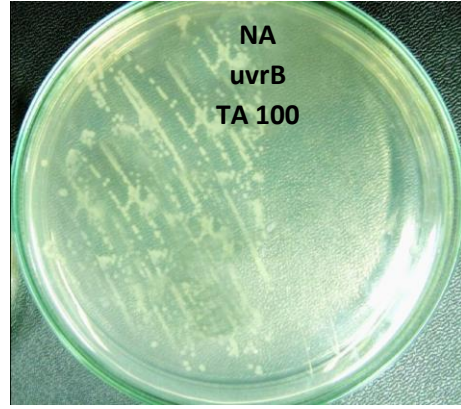
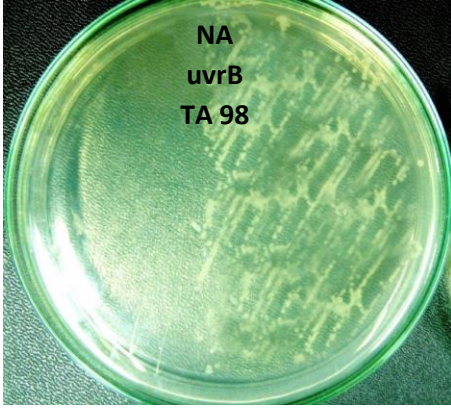
Resim 4.1 *S. typhimurium* TA 100 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



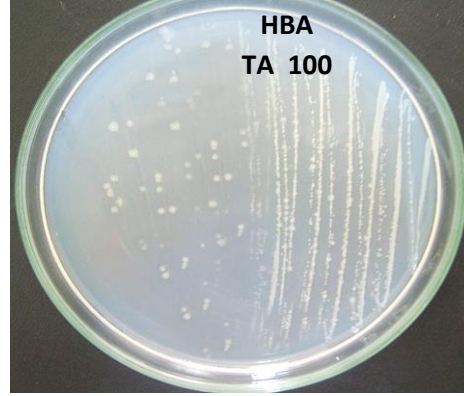
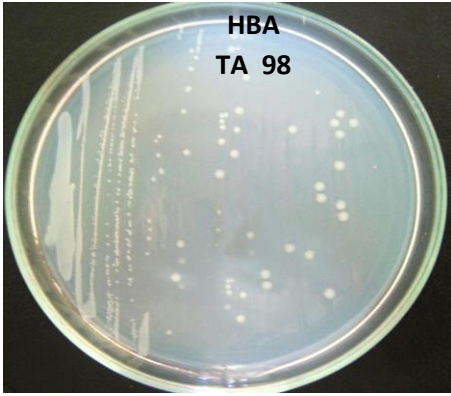
Resim 4.2 *S. typhimurium* TA 98 histidin gereksinimi kontrolü sonuçları



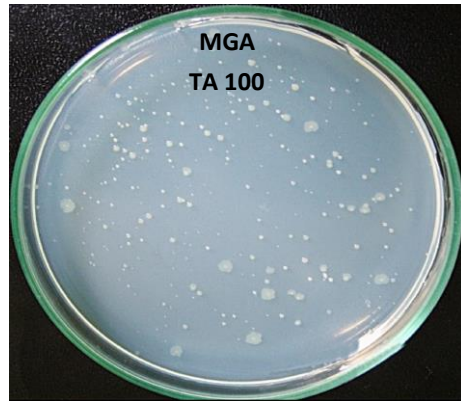
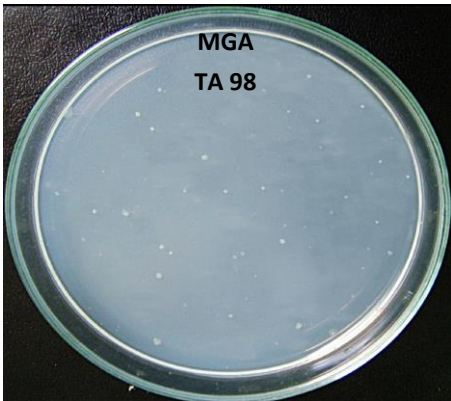
Resim 4.3 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının rfa mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 4.4 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının *uvrB* mutasyon kontrolü sonuçları



Resim 4.5 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının R-faktör mutasyonu kontrolü sonuçları



Resim 4.6 *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının spontan olarak geriye dönüş sıklığı kontrolü sonuçları

Kullanılan Test Maddesine Ait Bulgular

Yaptığımız çalışmada test maddemiz olan Halfenprox pestisinin farklı dozlarının mutajenik özelliğe sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla histidin üretmeyen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Çalışma sonunda bu suşların histidin üretebilir hale gelip gelmediklerine bakılarak bu pestisitinin mutajenitesi belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmada kullandığımız Halfenprox pestisiti suda çözünmediği için DMSO içerisinde çözdürülmüş ve sitotoksik etki gösteren dozları belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre Halfenprox pestisitinin 100µg/plak dozunun sitotoksik olduğu bulunmuştur ve mutajenite deneyinde sitotoksik dozun altındaki 6,25µg/plak, 12,5µg/plak, 25µg/plak, 50µg/plak ve 100µg/plak konsantrasyonları ile çalışılmıştır.

Pestisitinin hazırlanan konsantrasyonları TA 98 ve TA 100 suşları ile S9'lu ve S9'suz olarak plak inkorporasyon testleri yapılmış, her doz için 3 ayrı plak uygulanmış ve birbirinden bağımsız iki deney yapılmıştır. Deney sonuçlarının istatistiksel analizi yapılmış ve sonuçlar çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Halfenproxun *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda plak inkorporasyon testi sonuçları

| Test Maddesi | Konsantrasyon (µg/plak) | Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma | | | |
|------------------------|-------------------------|--|---------------|--------------------|----------------|
| | | TA98 | | TA100 | |
| | | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 |
| Halfenprox | 100 | 27,80±4,15 | 59,20±7,16* | 11,60±7,02 | 266,40±14,62* |
| | 50 | 26,20±4,16 | 56,80±4,76* | 108,40±4,72 | 227,20±4,49 |
| | 25 | 25,00±4,42 | 52,20±5,26 | 104,00±5,48 | 223,40±7,83 |
| | 12,5 | 25,60±2,97 | 51,40±8,65 | 103,40±10,6 0 | 217,40±6,73 |
| | 6,25 | 24,80±2,86 | 51,80±4,44 | 94,00±8,06 | 213,20±13,83 |
| Negatif Kontrol (DMSO) | 100 | 25,80±3,77 | 41,00±3,81 | 93,00±10,25 | 175,60±6,88 |
| SA | 10 | | | 2616,40±60, 29* | |
| 2AA | 5 | | | | 2245,20±80,03* |
| 2AF | 200 | | 927,20±15,27* | | |
| NPD | 200 | 1298,80±23,13* | | | |

*Kontrolde göre revertant sayısı $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (Dunnett-t testi) SA: Sodyum azid, 2AA: 2-aminoanthracene, 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-fenilendiamine.

Halfenprox pestisitinin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda S9'lu ve S9'suz ortamda revertant koloni sayılarındaki değişimler Dunnett-t testi ile incelenmiştir.

Histidin üretebilir hale gelen revertant kolonilerin sayısı, negatif kontrol grubunun koloni sayısı ile karşılaştırılmış ve buna göre negatif kontrol grubunun koloni sayısını iki katına çıkaran konsantrasyon değeri mutajenik konsantrasyon değeri olarak kabul edilmiştir. Koloni sayısında doza bağlı bir artış olması durumunda ise, bu maddenin, zayıf mutajenik etkiye sahip olduğu kabul edilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000).

Negatif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun etkisi de S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda kontrol edilmiştir. Negatif kontrolün koloni sayıları TA 98 için S9 varlığında 41,00±3,81, S9 yokluğunda 25,80±3,77 olarak, TA 100 için S9 varlığında 175,60±6,88, S9 fraksiyonu yokluğunda ise 93,00±10,25 olarak saptanmıştır.

Salmonella typhimurium en düşük koloni sayısı ise TA 100 suşunun S9 yokluğunda test maddesinin 100µg/plak konsantrasyonunda 11,60±7,02, en yüksek koloni sayısı TA 100 suşunun S9 varlığında test maddesinin 100µg/plak konsantrasyonunda 266,40±14,62 olarak saptanmıştır. TA 98 için en düşük koloni sayısı S9 fraksiyonu yokluğunda test maddesinin 6,25µg/plak konsantrasyonunda 24,80±2,86 olarak, en yüksek koloni sayısı S9 varlığında test maddesinin 100µg/plak konsantrasyonunda 59,20±7,16 olarak saptanmıştır.

Koloni sayısındaki değişiklikler *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için S9 yokluğunda kontrol grubuna göre yakın değerlerde artış gösterdiği için istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. TA 98 suşu için S9 varlığında ise 100µg/plak ve 50µg/plak konsantrasyonlarında koloni sayısı kontrol grubuna göre daha fazla artış göstermiş olup istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulunmuş, fakat kontrol grubunun iki katını aşmadığı için mutajenik etki göstermemiştir.

Her iki deneyde de test suşlarının geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 98 suşu için S9 varlığında 2-Aminofluorene ve S9 yokluğunda 4-Nitro-o-fenilendiamine kullanıldığında koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı olarak saptanmıştır.

Salmonella typhimurium TA 100 suşunun S9 yokluğunda tüm konsantrasyonlardaki koloni sayısı kontrol grubuna yakın değerlerde saptanmıştır. S9 varlığında 100µg/plak konsantrasyonda ise koloni sayısı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Ancak bu değer kontrol grubunun iki katını geçemediğinden mutajen etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. TA 100 suşunda da suşların geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif etki mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 100 için pozitif kontrol olarak S9 varlığında 2-aminoanthracene ve yokluğunda Sodyum azid kullanıldığında koloni sayısı her ikisinde de artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Genel olarak bakıldığında TA 98 veya TA 100 için yapılan tüm çalışmalarda S9 enzimi varlığında doza bağı olarak koloni sayısında artış gözlenmiştir, fakat tüm konsantrasyonlarda kontrol grubunun iki katını aşan bir değere rastlanmamıştır. Ayrıca S9 varlığında elde edilen koloni sayısının S9 yokluğuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde artan nüfusun gıda ihtiyacını yüksek verimle karşılamak amacıyla kullanımı artan, çeşitli kimyasallar ve zirai ilaçlar sağladıkları faydaların yanında insan ve çevre üzerinde karsinojenik ve mutajenik etkileri ile de olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Kullanılan bu kimyasal ve zirai ilaçların hangilerinin zararlı olduğu araştırılırken gün geçtikçe bir yenisini daha piyasaya sürülmektedir. Bu kimyasalların uygulanması sırasında ve uygulandıktan sonra kalıntı oluşturmalarıyla meydana gelebilecek zararlarını ortaya koymak için tehlike oluşturan dozunun ve organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan birçok çalışma sonucunda canlıların zararlı kimyasalların etkisine yaşam süresi boyunca maruz kalmaları halinde, canlı üzerinde genetik bozulmalara ve pek çok kanser türünün ortaya çıkmasına neden olduğuna inanılmaktadır.

Günümüzde pestisitler özellikle zirai alanda tahıl, sebze ve meyvelerde zararlı ve parazit etki gösteren böcek, akar, kurt, ot ve mantar gibi daha birçok zararlı organizma ile savaşmak, ürünlerin raf ömrünü uzatmak ve üretimde verimi artırmak amacıyla kullanılan kimyasallardır. Bu sebeplerle kullanılan pestisitlerin çevre ve gıda üzerinde kalıntı şeklinde bulunma riski gıdanın besin ögesi olarak kullanıldığı canlıda zamanla olumsuz sonuçlar doğurabileceği için bu pestisitlerin toksisitesi belirlenmeli ve risk değerlendirmesinin yapılması gerekmektedir. Pestisitlerin bazı gıdalarda kalıntı şeklinde bulunabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Çakır (2008), Çukurova yöresinde toplamış olduğu çiğ süt örneklerinde sentetik piretroid insektisit varlığını araştırmış ve bu süt örneklerinde λ -siyhalotrin, spermetrin, deltametrin, permetrin ve fenvalerent varlığını tesbit etmiştir. Bununla birlikte sözkonusu maddelerin tolerans limitleri göz önünde bulundurulduğunda örneklerden çıkan pestisit varlığı limitlerin üzerinde bulunmuştur.

Yapılan birçok çalışmada, gıdalardaki pestisit kalıntılarının vücuda alımı ile ortaya çıkan kronik etkisinin uzun vadede çeşitli kanser hastalıkları, akciğer rahatsızlıkları, beyinde hasar, karaciğer ve böbrekte nefrozlara sebep olduğu anlaşılmıştır. Teratojen, mutajen

ve alerjen etkisi olan pestisitler de mevcuttur. Pestisitlerin bu tür olumsuz etkilerinden korunabilmek için üreticilerin pestisit kullanımı konusunda daha dikkatli olmaları gerekmektedir. Üretici ve tüketicilerin hem kendi sağlıkları hem de çevre sağlığı açısından pestisitler ve bunların oluşturabilecekleri olumsuzluklar konusunda bilinçli olmaları gerekmektedir (Öğüt 2012).

Halfenprox pestisiti tarımsal mücadelede sebze ve meyvelerde akar ve diğer böceklerin kontrolü için yaygın olarak kullanılan piretroid grubu bir insektisit ve akarisitir. Halfenprox, kırmızı örümcek kontrolünün tüm evrelerinde kullanılmakta olup, meyve ağaçları kırmızı örümceklerinin, iki noktalı örümceklerin, turuncgiller, üzüm, sebzeler, çay ve birçok bitkinin meyvelerindeki pas akarlarının kontrolünde kullanılmaktadır (Tomolin 2009). Bu kadar çok kullanım alanına sahip olan bu pestisit kullanımının bilinçsiz yapılması halinde insan sağlığı açısından oluşturacağı tehlikelerin belirlenmesi de önem arz etmektedir. Bu çalışmada da bu amaçla Halfenprox pestisitinin mutajenik potansiyeli Ames Test sistemi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca çalışmamız da kullandığımız bu pestisit Türk Gıda Kodeksi tarafından 2009 yılında gıda maddelerinde bulunması gereken maksimum kalıntı miktarı ile kullanımına sınırlama getirilmiştir. Fakat birçok kesim tarafından kullanım dozuna dikkat edilmeksizin çoğu zirai ilaç bilinçsizce ve kullanılması gereken doz miktarından daha fazla miktarda kullanılmaktadır. Bu durumda bu kimyasal maddeler çevre ve canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Yaptığımız çalışmayla piretroid eter sınıfında yer alan Halfenprox pestisitinin mutajenitesine dair literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ames testi, pestisitler gibi birçok kimyasal maddelerin neden olduğu olası gen mutasyonlarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda herhangi bir bakteri suşunda ki pozitif sonuç, bir maddeyi mutajen olarak belirlemek için yeterlidir (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu testin temelinde *S. typhimurium* bakterisi histidin oksotrofu suşlarının histidin amino asitinden yoksun besi ortamında çoğaltıldığında histidin operonundaki geriye dönen mutasyonların belirlenmesidir (Singh 2009). Çalışmada kullanılan TA 98 suşu, çerçeve kayması mutasyonuna neden olan kimyasal maddelerin teşhisinde kullanılırken, TA 100

suşu ise baz değişimi mutajenlerinin teşhisinde kullanılmaktadır (Maron and Ames 1983). Deneylerde bu bakterileri kullanmamızın nedeni çerçeve kayması tipi ve baz-çifti değişim mutasyonlarının diğer mutasyonlara oranla daha fazla sıklıkta görülmesi ve bu suşların Ames testinde daha yaygın olarak kullanılmasıdır (Akyıl 2012).

Çalışmamızın memelilerde gerçekleşen biyotransformasyon olayına model olabilmesi için deneylere S9 fraksiyonu da eklenmiştir. Bu sayede çalışmada kullandığımız bakteri suşlarının metabolizması memelilerdeki detoksifikasyon metabolizmasına benzetilmiştir (Ames *et al.* 1973).

Ames'e (1973b) göre bakteri suşlarının spontan olarak his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içerisinde mümkündür. Bu değerler TA 98 için 20-50 revertant koloni, TA 100 için 75-200 revertant kolonidir. Araştırmamız sonucunda TA 98 ve TA 100 için S9 enzimi varlığında ve yokluğunda ortalama spontan koloni sayısı bu değerlere eşdeğer çıkmıştır. Bu değerlerin bu derece farklı olmaları çeşitli parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle her mutant suş için, kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı tek bir sayı olarak değil de, belirli bir aralıkta verilir. Bu parametreler arasında minimal ortamın tipi, glikoz-6-fosfat, β-NADP, fosfat tamponu, glikoz ve tuz çözeltisinin derişimi, petrillerdeki minimal agarın hacmi, top agarın miktarı ve yayılma şekli, etüvdeki nem oranı, S9 fraksiyonunun miktarı, minimal agarın bileşimi ve hazırlanmasındaki farklılıklar gibi etkileri sayabiliriz (Boath *et al.* 1980, Belser *et al.* 1981).

Halfenprox pestisitinin mutajenitesini araştırmak için yapmış olduğumuz Ames test yöntemi diğer mutajenite araştırmaları için bir ön adım teşkil etmektedir. Bu sonuçlar konusunda kesin yargıya varabilmek ve çalışmanın güvenilirliğini artırmak için diğer mutajenite ve genotoksisite testleri ile de çalışma desteklenmelidir.

Piretroid insektisitler memeli ve kanatlılar için son derece güvenli, ancak balıklar ve arılar için o ölçüde zehirli maddelerdir. Piretroidlerin zehirliliğini değiştiren bir takım faktörler vardır. Bu türden maddeler ağız, deri ve solunum yoluyla alınabilir ve bu maruziyete bağlı olarak da akut, subakut ve kronik nitelikte zehirlenmeler şekillenebilir.

Bununla birlikte insanlarda sentetik piretroidlere maruziyete bağlı olarak fenvalerent ve deltametrin ile ilgili Çin'de akut zehirlenme olayları kaydedilmiştir (akır 2008). Piretroidler, diğer insektisitlere oranla insanlar için daha güvenli olması, düşük dozlarında dahi yüksek insektisidal etkiye sahip bulunması ve çabuk parçalanması gibi özelliklerinden dolayı gittikçe artan bir kullanım alanına sahip olmuştur (WHO 2005).

Foster 1985 yılında piretroid grubu insektisitlerden biri olan Etofenprox ile yaptığı çalışmada *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 TA 1535, TA 1537 ve TA 1538 suşları kullanarak S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda Ames testini uygulamış ve sonuç olarak kullanılan tüm bu suşlarda revertant kolonilerde herhangi bir artış gözlenmemiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda kullanmış olduğumuz TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde elde ettiğimiz bulgular bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Pluijmen vd. (1984) piretroid grubuna dahil Sipermetrin, Permetrin, Deltametrin, Biyoresmetrin, Sismetrin ve Fenvalerat pestisitleri kullanılarak yaptıkları mutajenite çalışmasında TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajenik etkiye rastlamamışlardır.

Herrera and Laborda (1988) yaptıkları bir çalışmada piretroid grubuna dahil dört pestisitlerin Aletrin, Resmetrin, Permetrin ve Fenvalerat Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 100, TA 1538, TA 98, TA 1537, TA 97 ve TA 104 üzerinde mutajenitesini araştırmışlar ve sonuç olarak Resmetrin, Permetrin, ve Fenvalerat'ın S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda mutajen olmadığını saptamışlardır. Allethrin ise TA 100, TA 104 ve TA 97 suşları üzerinde S9 varlığında mutajen olarak bulunmuştur. Bizim kullandığımız pestisit de diğer üç pestisit gibi TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde benzer sonuçlar göstermiş olup herhangi bir mutajeniteye rastlanmamıştır. Allethrin'in TA 98 suşunun sonuçları bizim çalışmamızla paralellik göstermesine rağmen TA 100 suşunun sonuçları benzerlik göstermemektedir. Bu durumun aynı gruba dahil pestisitlerin olmasına rağmen pestisitlerin yan zincirlerinde yer alan farklı grup ve yapılardan kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Miadokova vd. (1992) yaptıkları çalışma ile piretroid grubuna dahil bir insektisit olan Superspermetrinin mutajenitesi araştırmışlar ve sonuç olarak TA 1535, TA 1538, TA 97, TA98 ve TA 100 suşları üzerinde S9 varlığında ve yokluğunda bu maddenin mutajen olmadığı anlaşılmıştır. Bir diğer çalışmada ise Basri vd. (2008) tarımda ve evlerde kullanılan, zararlı böcekler üzerinde geniş bir spektruma sahip sentetik florinatlı piretroid grubu insektisit olan Cyfluthrin'in TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde mutajenitesini araştırmışlar ve sonuç olarak S9 varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajenik etkiye rastlamamışlardır. Bu çalışmaların her ikisi de bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçları desteklemekte olup aynı suşlarda Halfenprox'da mutajenik bir etki göstermemiştir.

Sonuç olarak; Halfenprox pestisiti ile yapılan Ames testinde TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajenik etki saptanmamıştır. Yapılan diğer çalışmalara baktığımızda çalışmada kullandığımız pestisitle aynı gruba dahil diğer pestisitlerde TA 98 ve TA 100 suşlarında S9 varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajeniteye rastlanmamış olması bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Bu çalışmalar içerisinde sadece Allethrin TA 100, TA 104 ve TA 97 suşları üzerinde S9 varlığında mutajen olarak bulunmuştur (Herrera and Laborda 1988).

Ames testiyle yapılan çalışmalarda çok farklı sonuçların elde edilmesi test edilen maddenin molekül şekli, büyüklüğü ve üç boyutlu yapısı ile alakalı olabilir. Aynı zamanda test sistemi için kullanılan organizmanın türü de farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Eğer pestisitlere maruziyet söz konusu ise, maruz kalmış kişilerde oluşan farklı sonuçlar, bireylerin yaşam tarzı, çevresel ve iklimsel koşullar, kullanılan farklı pestisit ve kullanım miktarları, bireylerin beslenme alışkanlığı ve pestisite maruz kalma süresi ile yakından ilişkili olabilir. Bu faktörlerin yanında çeşitli genotoksik maddeler her organizmanın metabolizmasında çok farklı değişikliklere uğrayabilmektedir. Bu nedenle, bu maddelerin etkisine karşı hücresel seviyede oluşan farklılıklar da bu kadar farklı sonuç elde edilmesine neden olabilmektedir (Omenn 1991).

Ayrıca bu çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA100 suşlarında S9 varlığında da mutajen etkinin görülmemiş olması bu maddenin memeliler içinde mutajen olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda Halfenprox'un çalışmış olduğumuz tüm konsantrasyonlarında TA 98 suşunun belirlediği çerçeve kayması mutasyonlarına ve TA 100 suşunun belirlediği nokta mutasyonlarına sebep olmadığı tespit edilmiştir.

Kimyasal maddelerin çevremizde çok sayıda bulunması ve çok çeşitli olmaları, onların etki mekanizmalarının incelenmesini zorunlu kılmış ve bunun sonucunda birçok test sisteminin gelişmesine ve farklılaşmasına neden olmuştur. Kullanılan kimyasal maddelerin tek bir test sistemi ile araştırılmasıyla güvenilir sonuçlar elde edilememektedir. Çünkü farklı test sistemlerinde farklı yöntemler ve farklı organizmalar kullanıldığından dolayı elde edilen sonuçlarda çeşitlilik gösterebilmektedir. Bu sebepten, kimyasal bileşiklerin mutajenik özelliklerinin belirlenmesinde, tek bir test sistemi yerine, birkaç kısa zamanlı test sisteminin bir kombinasyonunun kullanılması elde edilen sonuçları daha güvenilir hale getirmektedir. Bu yüzden bu maddelerin farklı test sistemleriyle de değerlendirilerek sonuçların karşılaştırılması ve bu şekilde güvenilir bir sonuca varılması gerekmektedir. Bu sayede özellikle tarımda kullanılan pestisitler hakkında daha bilinçli olunabilir, çevre ve insan sağlığına zarar vermeden kimyasalların belirli dozlarda kullanımının sağlanması gerçekleştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Akçan, R. (2008). Pestisit Uygulanan Tavşanlarda Postmortem Kan ve Kemik İliğinde Pestisit Düzeylerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana.
- Aksoy, R. (1998). Genetik Ders Notları. Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Kars.
- Akyıl, D. (2006). Farklı Tipteki Fungusitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Üzerine Bir Çalışma. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Akyıl, D. (2012). Bazı Pestisitlerin Mutajenik ve Genotoksisitelerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Almaca, I.E. (1991). Fundamental of Microbiology. Third Edition, 175-182.
- Al-Saleh, I.A. (1994). Pesticides: Areview Article. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, **22(3)**: 265-270
- Ames , B. N. (1972). A bacterial system fr detecting mutagenes and carcingenes, in: Sutton, E.H. and Harris, I.M., (Eds.). *Mutagenic Effects of Envirmental Contaminants Academic Press*, New York, 57-66.
- Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E. (1973). An improved bacterial test systems for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, **70**: 782-786.
- Anonim, (2012). Pesticitler Kontrollü ve Bilinçli Kullanılmalı, Dünya Gıda Dergisi Nisan 2012, İstanbul.
- Arıkan, S. (2006). Quizalofop-p-etil Herbisitinin *Allium Cepa* L. Kök Meristem Hücreleri Üzerinde Stogenetik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Asal S. (1983). Türkiye’de Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Pestisitlerin Mutagen Etkilerinin *Salmonella typhimurium* Histidin Mutantlarıyla Saptanması Üzerinde Araştırmalar. Türkiyede Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormanlılık Araştırma Grubu, Ankara.

- Ateş, A. (2002) Moleküler Biyoloji 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113-121.
- Ateş, Ö. (2011). Bilecik Karasu Deresinin Mutajenitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Bağcı, H. (1985). Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
- Bahçeci, Z. (2002). Moleküler Biyoloji 2. Baskı, 10. Bölüm, Gazi Üniversitesi Kırşehir Eğitim Fakültesi, Ankara, 209-216.
- Bahçeci, Z. (2007). Moleküler Biyoloji. Göktuğ Basın Yayın Dağıtım ve Pazarlama, 323 s, Amasya.
- Bajpayee, M., Pandey, A. K., Parmar, D., Dhawan, A. (2005). Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs, *Toxicology Mechanisms and Methods*, Vol. 15, No. 3, pp. 155-180.
- Barış, A. (2007). Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajeniteleri Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Basri, H., Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., Kayraldız, A., Dönbak, L., ve Dağlıoğlu, Y.K. (2008). Genotoxic potential of cyfluthrin. *Mutation Research*, **1-2**: 49-50.
- Başaran, A., Başaran, N., Solak, M., Güneş, H. (1995). Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.
- Başaran, N. (2003). Tıbbi Genetik. Nobel Tıp Kitap Evi, 8. Baskı, Bursa, 165- 170.
- Belser, J., Shaffer, W.B., Bliss, S.D., Hynds, E.D, Yamamoto, H.M., Pitts, L., and Winer, J.A. (1981). A Standardized Procedure For Quantification Of The Ames/Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Environmental Mutagenesis*, **3**: 123-139.
- Berlie, F.A. (2004). Clinical toxicology Principles and Mechanism. Crc Press, Boca Raton, Florida, USA, 331-343.
- Bilge E. (1981). Genetik. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstanbul, 221.

- Boath, S.C., Welch, A.M, and Garner, R.C. (1980). Some Factors Affecting Mutant Numbers in *Salmonella*/Microsome assay. *Carcinogenesis*, **1(11)**: 911-923.
- Bozcuk, A. (2005). Genetik. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Palme Yayıncılık, Ankara, 215.
- Brown, L. M., Blair, A., Gibson, R., Everett, G.D., Cantor, K.P., Schuman, L. M., Burmeister, L. F., Van Lier, S. F. And Dick, F. (1990). Pesticide Exposures and Other Agricultural Risk Factors For Leukemia among Men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.*, **50**:6585-6591
- Brown, T.A. (2007). Genomes 3. Garland Science Publishing, 713 p, New York, USA.
- Bulmer, A. C., Ried, K., Coomes, J. S., Blanchfield, J. T., Toth, I., Wagner, K. H. (2007). The antimutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames *Salmonella* test, *Mutation Research*, **629**: 122- 132.
- Bütüner, B. ve Katrancı, G. (2006). Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Ankara, **35(2)**: 149-170.
- Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N. (1999). Genotoxic Evaluation Of The Pyrethroid Lambda-cyhalothrin Using The Micronucleus Test In Erythrocytes Of The Fish *Cheriodon interruptus*. *Mutat Research*, **438**:155-161.
- Canik, F., Yürekli, N. (2012). Gıda güvenliği ve pestisitler. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Temmuz 2012, 14(4)
- Cavaş, T., Ergene-Gözükara, S. (2003,). Evulation of The Genotoxic Potential Of Lambda-cyhalothrin Using Nuclear and Nuclear Biomarkers On Fish Cells. *Mutat Res.*,**534**:93-99.
- Cerna, M., Pastorkovea, A., Smid, J., Dobias, L. and Rossner, P. (1998). The use of YG bacterial tester strains for monitoring of drinking water mutagenicity. *Toxicology Letters*, **96**: 335-339.
- Chiu, B. C-H., Weisenburger D. D., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Gapstur, S. M., Holmes, F., Burmeister, L. F. And Blair, A. (2004). Agricultural Pesticide Use, Familial Cancer and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13 (4)**: 525-531.

- Costa, C., Silva, S., Coelho, P., Roma-Torres, J., Teixeira, J.P., Maya, O. (2007). Micronucleus Analysis In A Portuguese PoPulation Exposed To Pesticides: Preliminary Survey. *Int J Hyg Environ Health*, **210**: 415-418.
- Costa, L. (2007). Toxic Effect of Pesticides. Casarett & Doull's Toxicology, The basic Science of Poisons, 7 st Edition, Klaassen C.D. Editor, The McGraw-hill Companies Inc., USA, 883-931.
- Çağlarırnak, N. (2007). Gıda güvenliğinin çevre kirliliği yönünden irdelenmesi. 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongre Kitabı, İzmir, 781-785.ü
- Çakır, S. (2008). Çukurova Yöresinde Toplanan Sütlerde Sentetik Piretroid İnsektisid Varlığının Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çalışkan, M. (2010). The Effects of the Synythetic Pyrethroid Insecticide Tetrametrin on the Serum Proteins of Albino Mice (*Mus Musculus*), Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, Ankara **67 (2)**:65-71
- Çelik, A., Mazmancı, B., Çamlıuca, Y., Aşkın, A., Çömelekoğlu, U. (2003). Cytogenetic Effects Of Lamda-cyhalothrin On Wistar Rat Bone Marrow. *Mutat Res.*, **539**:91-97.
- Çolak, İ. (2009). Sentetik Piretroidlerde Enantiomerik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dağlıoğlu N. (2004). Akut Organofosfatlı Pestisit Entoksikasyonlarının Sıçanlarda Deneysel Olarak Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- De Serres, F.J. (1976). Report of the conference on in vitro mutagenicity and carcinogenicity test. *Mutat Res*, **41**:395-400
- Delen, N., Günör N., Durmuşoğlu, E., Turgut, C., Gürcan, A., Burçak, A. (2005,). Türkiyede Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalış Sorunları. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara,
- Demirsoy, A. (1991). Biyoloji Genetik. Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Lisans Tamamlama Programı.

- Demirsoy, A. (1992). Yaşamın Temel Kuralları, Genel Biyoloji 1, Ankara.
- Demirsoy, A. (2003). Yaşamın Temel Kuralları. Meteksan A.Ş., Ankara, 770.
- Durusoy, M. and Kambur, S. (2003). The application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water. *Turkish Journal of Biochemistry*, **28(1)**: 3-7.
- Elersek, T. and Filipic, M. (2011). Organophosphorus Pesticides- Mechanisms Of Their Toxicity. Pesticides- The Impact of Pesticide Exposure, National Institute of Biology, Slovenia.
- EMEA, (1998). Committee For Veterinary Medicinal Products, Chrysanthemi Cinerarifloei Flos and Pyrethrum Extract, Summary Report, EMEA/MRL/362/98-Final.
- Eren, Y. (2011). Bazı Limonium Türlerine Ait Bitki Ekstrelerinin Mutajenik Etkilerinin Farklı Test Sistemleri ile Belirlenmesi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Erensayın, C. (2000). Genetik. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 165-183.
- Ergin, E. (2009). Bazı Rutenyum bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Testi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1-50.
- Erkan, S. (1992). Moleküler Biyoloji. Doğruluk Matbaacılık Ltd.Ş., İzmir 30-52.
- Falakalı, B. (1993). Genel Genetik. Ege Üniversitesi, İzmir, 84-97. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 177-122.
- Garcia, A. M., Benavides, F. G., Fletcher, T. and Orts, E. (1998). Paternal Exposure to Pesticides and Congenital Malformations. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, **24 (6)**: 473-480.
- Gathouse, D., G., Rowland, I.R., Willox, P., Dander, R.D. and Foster, R. (1998). Bacterial Mutation Assay, Basic Mutagenic Recommended Procedure The Bath, Press, Avon Research, 227-234.
- Gomes-Carneiro, M. R., Dias D. M. M., Paumgarten, F. J. R. (2006). Study on the mutagenicity and antimutagenicity of β -ionone in the *Salmonella*/microsome assay. *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 522-527.

- Görmez, E. (2012). Alaşehir (Manisa) Bölgesi Bağ Alanlarında Kullanılan Bazı Pestisit Kalıntılarının Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Grossman, N. (2007). Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on histamine release from isolated rat mast cells. *Inflammation Research*, **56**: 473-478.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z. (1997). Pestisitler. Bölüm 1, Sağlık Bakanlığı Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No:52, 1.Baskı, Ankara.
- Haya, K. (1989). Toxicity of Pyrethroid Insecticides to Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**: 381-391.
- He, L.M., Troiano, J., Wang, A., and Goh, K. (2008). Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of Imada-cyhalothrin. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **195**: 71-91.
- Herrera A. And Laborda E. (1988). Mutagenic activity in synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium*. *Oxford JournalsLife Sciences & MedicineMutagenesis*, **3**: 509-514.
- IARC, (1980). Monographs on the evaluation of the corcinogenic risk of chemicels to humans, Suppl.2, Long Term and Short Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, International Agency For Research on Cancer.
- IPCS- International Programme On Chemical Safety, (2001). Deltametrin In: Pesticide Residues In Food. Evaluations 2000, Part II – Toxicological. Joint FAO/WHO Meeting Pesticide Residues (JMPR), Geneva, World Health Organization (WHO/PCS 01.3): 79-110.
- İncedere, F.E. (2009). Bazı Pestisitlerin Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- İşcan, G. (2009). Bazı Doğal Aromatik Maddelerin Mikrobiyal Transformasyonu ve Biyolojik Etkileri. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Jenner, P. (2001). Parkinson's Disease, Pesticides and Mitochondrial Dysfunction. *Trends in Neurosciences*, **24 (5)**: 245-246.

- Ji, b. T., Silverman, D. T., Stewart, P. A., Blair, A., Swanson, G. M., Baris, D., Greenberg, R. S., Hayes, R. B., Brown, L. M., Schwartz, A. G. and Hoover R. N. (2001). Occupational Exposure to Pesticides and Pancreatic Cancer. *Am. J. Ind. Med.*, **39** (1): 92-99.
- Kahraman, N. (2008). Organofosfat ve Karbamat İçeren İnsektisit Maruziyeti ile Acil Servise Başvuran Hastaların Serum Asetilkolinesteraz Düzeyleri ile Klinik Seyir ve Mortalitetleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, İzmir.
- Kamal, A.A.M., Elgary, M.T., Maklady, F., Mostafa, M.A., and Massaud, A. (1990). Serum cholinesterase and liver function among a group of organophosphorus pesticides sprayers in Egypt. *Journal of Toxicology Experimentale*, 10, 7–8, 427–435.
- Karadayı M. (2010). *Origanium Vulgare L. ssp vulgare'* den Elde Edilen Bazı Etken Maddelerin Ames/*Salmonella* ve *E.coli* Wp2 Test sistemleri ile Mutajen ve Antimutajen Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kho, R., Hodges, J.A., Hansen, M.R., and Villar, H.O. (2005). Ring system in mutagenicity databases. *J. Med. Chem.*, **48**: 6671-6678.
- Klassen C.D., and Amdur M.O. (2001). Doull J. Casarett and Doull's Toxicology. Basic Science of Poisons, 6th Edition, McGraw-Hill International Editions, New York, 763-784.
- Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (2001). Casarett and Doull 's Toxicology: Basic Science of Poisons. 6 Edition, McGraw-Hill International Editions, New York.
- Klug, W.S., and Cummings, M.R. (2003). Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara, 816.
- Konuk, M., Barış, A., Liman, R., ve Akyıl, D. (2008), A Study On Mutagenicity Of Different types Of Pesticides By Using Of Ames/ *Salmonella* /Microsome Test system. *Fresenius Environmental Bulletin*, **17(4)**: 463-466.
- Korkmaz B. (2005). Bazı 2-Sübstitüe Primidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi İle Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Kovanko, N. V. and Kaskan, Zh. N. (2004). Advances in the Synthesis of Neonicotinoids. *Russian J. of Organic Chem.*, **40 (12)**: 1709-1726.
- Kumbur, H., Özer, Z., ve Özsoy, H.D. (2005). Tarım ilaçlarının (Pestisitlerin) Çevresel Etkileri ve Mersin İli'nde Kullanım Düzeyleri. In: GAP, IV. Tarım Kongresi, Bildiri Kitapçığı, 702–707.
- Kuru, M. ve Gözükara, S.E. (2001). Genetik. Palme Yayıncılık No:186, 360 s, Anka.
- Kuru, M., ve Ergene, S. (2005). Genetik (Örnek Problemlerle). Palme Yayıncılık, 2. Baskı, Ankara, 250-260
- Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y., ve Konuk, M. (2010). Testing Of The Mutagenicity and Genotoxicity Of Metolcarp By Both Ames/*Salmonella* and Allium Test. *Chemosphere*, **80**: 1056-1061.
- Malley M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *The Lancet*, **349**: 1161-1166.
- Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**: 173-215.
- Marrs, T.C. (1993). Organophosphate poisoning. *Pharmacology Therapeutics*, **58**: 51 66.
- Mazmancı B., Tamer L., ve Aşkın A. (2008). Sıçanlarda lambda-cyhalothrin'in akut toksik etkisinin araştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **1(1)**: 15-9.
- Mc Cann, J., and Ames, B.N. (1976). Detection of carcinogens as mutagenes in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, **73**: 950-954.
- Miadokova, E., Vickova, V., Duhova, V., Trebaticka, M., Garajova, K., Grolmus, J., Podstavkova, S., and Vicek, D. (1992). Effects of supercypermethrin, a synthetic developmental pyrethroid, on four biological test systems. *Mutation Research*, September 1992, **3**: 161-168.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**: 29-60.
- Mumcu, E. (2005). Seydi Çayı (Eskişehir) Çevresinde toplanan su toprak örneklerinden Ames/*Salmonella*/Mutajenite testi ile bor elementinin Mutajenitesinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Nakamura, K., Veno, H. and Sayato, Y. (1992). Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method. *Water Sciences Technology*, **25(11)**: 293-299.
- Omenn, G.S. (1991). Future research directions in cancer ecogenetics. *Mutation Research*, **247**: 283-291.
- Oros, D.R., and Werener, I. (2005). Pyrethroid insecticides: An Analysis of use patterns, distributions, potential toxicity and fate in the Sacramento–San Joaquin Delta and Central Valley. White Paper for the Interagency Ecological Program SFEI Contribution, San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA, USA, 415.
- Öğüt , S. (2012). Isparta Yöresinde Kullanılan Bazı Pestisitlerin Elma ve Kirazlardaki Pestisit Kalıntıları ve Bu Ürünlerin Tarımında Çalışan Tarım İşçilerinin Kan Parametrelerine Etkilerin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Entitüsü, Isparta.
- Öğüt, S., Çetin, G.N., ve Küçüköner, E. (2008a). Isparta ve çevre ilçelerde tarımsal üretimde kullanılan pestisitlerin uygulayıcılar üzerindeki akut etkileri. *Toksikoloji Dergisi*, **6 (1–2)**: 69-72.
- Öner, C. (2003). Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, 6. Baskıdan çeviri, Türkiye, 455-567.
- Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Öğüş, A. ve Açık, L. (2009). Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık No: 506, 677 s, Ankara
- Özbek, T., Güllüce, M., Şahin, F., Özkan, H., Sevsay, S. and Barış, Ö. (2008). Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Turkish Journal of Biology*, **32**: 271-276.
- Pan American Health Organization, (2002). Epidemiologic situations of Acute Pesticide Poising in Central America. 1992-2000, Epidemiological Bulletin, **23**: 5-9.
- Petek, M. (1999). İstanbul Boğazındaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Etkilerinin, *Salmonella*/mikrozom Test Sistemi İle Araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.
- Piner, P. (2009). Lamda-cyhalohrinin *Oreochromis niloticus*'da Karaciğerde piperonil Bütoksit Modülatörlüğünde Oksidatif Stres Potansiyelinin Belirlenmesi, Stres

Proteinleri ve Apoptozis Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Adana.

Pluijmen, M., Drevon, C., Montesano, R., Malaveille, C., Hautefeuille, A., and Bartsch, H. (1984). Lack of mutagenicity of synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium* strains and in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, July 1984, **1**: 7-17.

Quillardet, P., and Hofnung, M. (1985). The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures. *Mutation Research*, **147**: 65-78.

Ramel, C., and Rannung, U. (1980). Short- term mutagenicity test. *Enviromental Healt.*, **6**: 1065-1076.

Ribas, G., Surrales, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., and Marcos, R. (1996). Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, **11**: 221-227.

Sağlam H. (2008). Melen Havzasında Pestisit Uygulamaları ve Pestisitlerin Biyolojik Bozunma, Yüzeysel Akış ve Sızma Yüzdelerinin Tahmini. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Sağlam, N. (2000). Biyoloji eğitiminde Moleküler Genetik. Ankara, 106.

Satologlu, N., Aydın B., ve Turla A. (2007). Pestisit Zehirlenmeleri. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **6(3)**: 169-174.

Singer, B., and Gerunbeger, D. (1994). Molecular Biology of Mutagenesis and Carcinogensiss, 335.

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

Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., and Weiner, M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, **171**: 3-59.

- Soysal, Z. (2009). Bazı Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Ames Test Sisitemi ile Mutajenik Potansiyellerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Synder, L., and Campness, W. (2007). Third Edition Moleküler Genetik of Bacteria. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University East Lansing, Michigan Washington, DC 492.
- Temizkan, G.O. (1996). Moleküler Genetik. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 281.
- Tiryaki, O., Canhilal, R., ve Horuz, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **26(2)**: 154-169
- Tübitak, (1985). Postgraduate Summer Course Notes on Molecular Biology and Genetics Engineering (in Turkish). Tübitak, 29 July-16 August M.E.T.U. Department of Biology.
- Uysal, A. (2006). Bazı Bitki Gelişim Düzenleyicilerin *Salmonella*/Mikrozom Test Sisiteminde Mutajenik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Viel, J. F. and Chalier, B. (1995). Bladder Cancer among French Farmers: does Exposure to Pesticides in Vineyards Play a Part? *Occup. Environ. Med.*, **52**: 587-592.
- Villarini, M., Moretti, M., Pasquini, R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli, M., Monarca, S., and Rodriguez, A.V. (1998). *In vitro* Genotoxic Effects Of The Insecticide deltamethrin In Human Peripheral Blood Leukocytes: DNA Damage (Comet assay) Relation To The Induction Of Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Toxicology*, **130**: 19-139.
- Vural N. (1996). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73:342-373.
- Vural, N. (1984). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, No. 56, 32-81.
- Vural, N. (1996). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara. 344-363.
- Vural, N. (2005). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 344-379.
- Waddel, B. L., Zahm, S. H., Baris, D., Weisenburger, D. D., Holmes, F., Burmeister, L. F., Cantor, K. P. and Blair, A. (2001). Agricultural use of Organophosphate Pesticides

and The Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma among Male Farmers (United States). *Cancer Causes Control*, **12**: 509-517.

- Ware, G.W. (1986). *Fundamentals of Pesticides* 2.cilt. Thomson Publications, USA.
- World Health Organization (WHO), (1986). *Carbamate Pesticides. A General Introduction*, Environmental Health Criteria 64, Geneva.
- World Health Organization (WHO), (1990). *International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 98 Tetrametrin*, Geneva.
- World Health Organization (WHO), (2004). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 16-26.
- World Health Organization (WHO), (2005). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2004*. Switzerland.
- World Health Organization (WHO), (2005). *Safety Of Pyrethroids For Public Health Use*. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP, Geneva, 2005.10.
- Yapıcı, S. (2013). *Bitki Gelişiminde Kullanılan Bazı Meddelerin Mutajenik Etkilerinin Salmonella Ames Mikrozom Testi İle Araştırılması*. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., ve Tanyolaç, B. (2007). *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 613.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., Karadağ, Y., ve Sakin, M.A. (2010). *Genetik*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 270.
- Yılmaz F. (2013). *Etofenprox'un Genotoksik Etkilerinin Çin Hamsteri Ovaryum Hücrelerinde Micronükleus ve Komet Testleri Kullanılarak Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa
- Yüksel, N. (1999). *Sitokrom P-450 Enzim Sistemi ve İlaç Etkileşimleri*. 35. Ulusal Psikiyatri Kongresi, Trabzon.
- Yüksel, S. (2005). *Bazı Sübstitüe Benzilidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Salmonella Mutajenite Testi ile Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Zheng, T., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Zhang, Y. and Blair, A. (2001). Agricultural Exposure to Carbamate Pesticides and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Joem*, **43**: 641-649.

İnternet Kaynakları

1. www.bilgiustam.com/pestisit-nedir-tarimsal-ve-kimyasal-pestisidin-zararlari-nelerdir/ 15.06.2013
2. <http://www.bahcesel.net/vikisel/bitki-koruma-urunlerinde-kullanilan-maddeler-8/halfenprox-44857/> 04.04.2013
3. www.ansiklopedim.info/?p=320 08.10.2013
4. www.tfd.org.tr/eski/KTCG_Kurs_042010/02_AK.pdf 08.10.2013
5. www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc 08.10.2013

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice Efecan
Doğum Yeri ve Tarihi : Burdur 06.06.1987
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05057894906 / hatice_dere@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Burdur Cumhuriyet Lisesi (Y. A. L) / 2001-2005

Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi / 2005-2009

Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi / 2011-2013